

SMALL VOLUME IN VITRO ANALYTE SENSOR WITH DIFFUSIBLE OR NON-LEACHABLE REDOX MEDIATOR

Patent number:	<u>WO0020626</u>	Also published as:
Publication date:	2000-04-13	<input type="checkbox"/> EP1119637 (A1)
Inventor:	FELDMAN BENJAMIN J; HELLER ADAM; HELLER EPHRAIM; MAO FEI; VIVOLO JOSEPH A; FUNDERBURK JEFFERY V; COLMAN FREDRIC C; KRISHNAN RAJESH	<input type="checkbox"/> US6338790 (B1)
Applicant:	THERASENSE INC (US)	<input type="checkbox"/> CA2346415 (A1)
Classification:		<input type="checkbox"/> EP1119637 (B8)
- international:	C12Q1/00	<input type="checkbox"/> EP1119637 (B1)
- european:	C12Q1/00B	more >>
Application number:	WO1999US23425 19991008	Cited documents:
Priority number(s):	US19980103627P 19981008; US19980105773P 19981008; US19990295962 19990421	<input type="checkbox"/> WO9835225
		<input type="checkbox"/> WO9109139
		<input type="checkbox"/> WO9700441
		<input type="checkbox"/> US5695947
		<input type="checkbox"/> XP004012315

Abstract of **WO0020626**

A sensor utilizing a non-leachable or diffusible redox mediator is described. The sensor includes a sample chamber to hold a sample in electrolytic contact with a working electrode, and in at least some instances, the sensor also contains a non-leachable or a diffusible second electron transfer agent. The sensor and/or the methods used produce a sensor signal in response to the analyte that can be distinguished from a background signal caused by the mediator. The invention can be used to determine the concentration of a biomolecule, such as glucose or lactate, in a biological fluid, such as blood or serum, using techniques such as coulometry, amperometry, and potentiometry. An enzyme capable of catalyzing the electrooxidation or electroreduction of the biomolecule is typically provided as a second electron transfer agent.

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-526759

(P2002-526759A)

(43) 公表日 平成14年8月20日 (2002.8.20)

(51) Int CL ⁷	識別記号	F I	マークド (参考)
G 01 N	Z 7/327	G 01 N 27/42	G 2 G 0 4 5
	27/418	33/483	F 4 B 0 8 3
	27/42	33/66	C
	33/483	C 12 Q 1/26	
	33/66	G 01 N 27/80	8 5 8 R

審査請求 有 予審審査請求 有 (全 175 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2000-574718(P2000-574718)
(36) (22) 出願日	平成11年10月8日(1999.10.8)
(36) 領域文提出日	平成13年4月9日(2001.4.9)
(36) 國際出願番号	PCT/US99/23426
(37) 國際公開番号	WO00/20626
(37) 國際公開日	平成12年4月13日(2000.4.13)
(31) 優先権主張番号	60/103, 627
(32) 優先日	平成10年10月8日(1998.10.8)
(39) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	60/105, 779
(32) 優先日	平成10年10月8日(1998.10.8)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(71) 出願人	セラセンス、インク. アメリカ合衆国、94502 カリフォルニア 州、アラメダ、サウス ループ ロード 1360
(72) 発明者	フェルドマン、ベンジャミン、シェイ. アメリカ合衆国、94818 カリフォルニア 州、オークランド、コルビー ストリート 5890
(72) 発明者	ヘラー、アダム アメリカ合衆国、78758 テキサス州、オ ースチン、アパートメント 271、スパイ スウッド スプリングス ロード 4711
(74) 代理人	弁理士 池内 寛幸 (外3名)
	最終頁に続く

(54) 【発明の名前】 非浸出性または拡散性の酸化還元媒介剤を用いた小体積生体外分析物センサー

(57) 【要約】

非浸出性または拡散性の酸化還元媒介剤を利用したセンサーについて述べる。前記センサーは、試料を作用電極と電解接觸させておくための試料室を備え、少なくともいくつかの例においては、上記センサーは、さらに非浸出性または拡散性の第2の電子移動剤を含有する。本発明で使用されるセンサーおよび/または方法においては、上記媒介剤によるバックグラウド信号とは区別可能なセンサー信号が分析物に反応して発せられる。本発明は、血液または血清等の生体液中におけるグルコースまたはラクテート等の生体分子の濃度を、クロメトリー、アンペロメトリー、およびボテンシオメトリー等の技術を用いて測定するのに用いることができる。第2の電子移動剤としては、生体分子の電気活性化または電気還元を触媒できる酵素が一般的に用いられる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 作用電極と対電極とを含み、前記作用電極の少なくとも一部が前記対電極の少なくとも一部から $200\mu\text{m}$ 以下の距離内にあり、前記対電極が任意に対／参照電極である電極対と、

任意に設けられる参照電極と、

試料液を、前記作用電極と、前記対電極と、前記参照電極が設けられていれば前記参照電極とに電解的に接触させて保持するための試料室と、

前記測定域内に配置された分析物応答性酵素および拡散性酸化還元媒介剤とを備え、

前記試料室は、前記作用電極と、前記対電極と、前記参照電極が設けられていれば前記参照電極とに隣接する約 $1\mu\text{L}$ 以下の体積の試料液を収容する大きさに設定された測定域を含み、任意に約 $1\mu\text{L}$ 以下の体積の試料液を収容する大きさに設定されており、

前記拡散性酸化還元媒介剤によって発生するバックグラウンド信号が、平均的な生理学的正常量の分析物の酸化または還元によって発生する信号の5倍以下となるように構成および配置された、試料液中における分析物濃度を測定するためのセンサー。

【請求項2】 作用電極と対電極とを含み、前記作用電極の少なくとも一部が前記対電極の少なくとも一部から $200\mu\text{m}$ 以下の距離内にあり、前記対電極が任意に対／参照電極である電極対と、

任意に設けられる参照電極と、

試料液を、前記作用電極と、前記対電極と、前記参照電極が設けられていれば前記参照電極とに電解的に接触させて保持するための試料室と、

前記測定域内に配置された分析物応答性酵素および拡散性酸化還元媒介剤とを備え、

前記試料室は、前記作用電極と、前記対電極と、前記参照電極が設けられていれば前記参照電極とに隣接する約 $1\mu\text{L}$ 以下の体積の試料液を収容する大きさに設定された測定域を含み、任意に約 $1\mu\text{L}$ 以下の体積の試料液を収容する大きさに設定されており、

前記拡散性酸化還元媒介剤によって発生するバックグラウンド信号が、平均的な生理学的正常量からの平均偏差に相当する量の分析物の酸化または還元によって発生する信号の5倍以下となるように構成および配置された、試料液中における分析物濃度を測定するためのセンサー。

【請求項3】 前記拡散性酸化還元媒介剤によって発生するバックグラウンド信号が、平均的な生理学的正常量の分析物の酸化または還元によって発生する信号と同等か、またはそれを下回るように、好ましくは、予想量の分析物の酸化または還元によって発生する信号の25%以下、より好ましくは5%以下となるように構成および配置された請求項1および2のいずれか1項に記載の記載のセンサー。

【請求項4】 作用電極と対電極とを含み、前記作用電極の少なくとも一部が前記対電極の少なくとも一部から200μm以下の距離内にあり、前記対電極が任意に対／参照電極である電極対と、

任意に設けられる参照電極と、

試料液を、前記作用電極と、前記対電極と、前記参照電極が設けられていれば前記参照電極とに電解的に接触させて保持するための試料室と、

前記測定域内に配置された分析物応答性酵素および拡散性酸化還元媒介剤とを備え、

前記試料室は、前記作用電極と、前記対電極と、前記参照電極が設けられていれば前記参照電極とに隣接する約1μL以下の体積の試料液を収容する大きさに設定された測定域を含み、任意に約1μL以下の体積の試料液を収容する大きさに設定されており、

分析物がグルコースであり、前記拡散性酸化還元媒介剤によって発生するバックグラウンド信号が、5mMのグルコースの酸化または還元によって発生する信号の5倍以下となるように構成および配置された、試料液中における分析物濃度を測定するためのセンサー。

【請求項5】 (a) 基部側の端部と末端側の端部とを有し、前記基部側の端部から前記末端側の端部にむかって伸びる前記電気化学センサーの第1側縁部と第2側縁部とを定め、前記末端側の端部がセンサー読取装置に挿入されるように

構成および配置された第1基板と、

(b) 前記第1基板の上方に配置される第2基板と、

(c) 前記第1および第2基板の間に配置され、前記センサーの前記第1側縁部に沿った第1孔と前記第2側縁部に沿った第2孔とを定め、前記試料室が前記第1孔から第2孔にまで達しているスペーサーと、

(d) 前記第1および第2基板のいずれか1つに配置され、前記試料室がいつ試料を収容したかを測定するため、前記試料室を基準にして配置された少なくとも1つの指示電極とを備え、

前記作用電極が前記第1および第2基板のいずれか1つに配置され、前記対電極が前記第1および第2基板のいずれか1つに配置されている、請求項1～4のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項6】 (a) 基部側の端部と末端側の端部とを有し、前記基部側の端部から前記末端側の端部にむかって伸びる前記電気化学センサーの第1側縁部と第2側縁部とを定め、前記末端側の端部がセンサー読取装置に挿入されるように構成および配置された第1基板と、

(b) 前記第1基板の上方に配置される第2基板と、

(c) 前記第1および第2基板の間に配置され、前記センサーの前記基部側の端部に沿った第1孔と前記第1側縁部に沿った第2孔とを定め、前記試料室が前記第1孔から第2孔にまで達しているスペーサーと、

(d) 前記第1および第2基板のいずれか1つに配置され、前記試料室がいつ試料を収容したかを測定するため、前記試料室を基準にして配置された少なくとも1つの指示電極とを備え、

前記作用電極が前記第1および第2基板のいずれか1つに配置され、前記対電極が前記第1および第2基板のいずれか1つに配置されている、請求項1～4のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項7】 前記測定域が試料を収容したことを知らせるため、センサー内に配置された指示電極を備えた請求項1～4のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項8】 前記指示電極が、作用電極または対電極でもある請求項5～7のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項 9】 前記指示電極に接続され、前記指示電極が前記測定域に試料が収容されたことを知らせるとアクティブ化する視覚的または聴覚的サインをさらに備えた請求項 5～8 のいずれか 1 項に記載のセンサー。

【請求項 10】 前記指示電極が、前記作用電極または前記対電極のいずれか 1 つと対向関係にある請求項 5～9 のいずれか 1 項に記載のセンサー。

【請求項 11】 前記センサー内に配置された少なくとも 2 つの指示電極を備え、第 1 の指示電極が前記測定域への試料の充填が開始されたことを知らせ、第 2 の指示電極が前記測定域が実質的に試料で満たされたことを知らせる請求項 1～10 のいずれか 1 項に記載のセンサー。

【請求項 12】 センサー内に配置された少なくとも 2 つの指示電極を備え、前記 2 つの指示電極は、第 1 の対／指示電極と第 2 の対／指示電極とを含み、前記対電極が前記第 1 および第 2 の対／指示電極間に配置されている請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載のセンサー。

【請求項 13】 前記測定域の体積と前記試料室の体積とが同等である請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載のセンサー。

【請求項 14】 前記分析物がグルコースであり、前記分析物応答性酵素がグルコース応答性酵素である請求項 1～3 および 5～13 のいずれか 1 項に記載のセンサー。

【請求項 15】 前記分析物が薬物である請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載のセンサー。

【請求項 16】 前記測定域の少なくとも 2 つの側面が前記作用電極および前記対電極によってその範囲を限定され、前記作用電極と前記対電極とが、前記測定域を間に有する対向電極対を任意に形成する請求項 1～15 のいずれか 1 項に記載のセンサー。

【請求項 17】 前記酸化還元媒介剤が前記分析物を酸化し、pH 7 の 0.1 M の NaCl でのサイクリックボルタントリーによって測定した前記酸化還元媒介剤の半波電位が、対／参照電極の電位に対して約 +100 ミリボルト以下となるように構成および配置された請求項 1～16 のいずれか 1 項に記載のセンサー。

【請求項18】 前記酸化還元媒介剤が前記分析物を酸化し、pH7の0.1MのNaClでのサイクリックボルタンメトリーによって測定した前記酸化還元媒介剤の半波電位が、対／参照電極の電位とほぼ同等になるように構成および配置された請求項1～17のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項19】 前記酸化還元媒介剤が前記分析物を酸化し、pH7の0.1MのNaClでのサイクリックボルタンメトリーによって測定した前記酸化還元媒介剤の半波電位が、対／参照電極の電位に対して約-150ミリボルト以下となるように構成および配置された請求項1～18のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項20】 前記センサー内において、前記試料液中における前記酸化還元媒介剤の有効拡散係数が、前記試料液中における前記分析物の有効拡散係数を下回り、好ましくは、前記試料液中における前記分析物の有効拡散係数より少なくとも10倍少ない請求項1～19のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項21】 前記拡散性媒介剤の分子量が、少なくとも5,000ダルトンである請求項1～20のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項22】 前記酸化還元媒介剤が、前記対電極上よりも前記作用電極上において、より容易に電気分解されるように構成および配置された請求項1～21のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項23】 前記酸化還元媒介剤のモル量が、化学量論的に、分析物の平均的な生理学的正常量以下、好ましくは、化学量論的に、分析物の平均的な生理学的正常量の約20%以下である請求項1～21のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項24】 前記測定域に露出する前記作用電極の表面積が約0.01cm²以下である請求項1～23のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項25】 前記酵素の活性度が、1ユニット/cm³以下である請求項1～24のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項26】 前記拡散性酸化還元媒介剤が、前記対電極で反応して析出するよう構成および配置された請求項1～25のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項27】 試料液が前記測定域を満たしている場合に、前記酸化還元媒

介剤の有効拡散係数と前記酸化還元媒介剤の濃度との積が、 1×10^{-11} モル・c
m⁻¹秒⁻¹以下である請求項1～26のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項28】 前記拡散性酸化還元媒介剤が前記作用電極上に配置されている請求項1～27のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項29】 前記分析物応答性酵素が、前記作用電極上に配置されている請求項1～28のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項30】 (a) 基部側の端部と末端側の端部とを有し、前記基部側の端部から前記末端側の端部にむかって伸びる前記電気化学センサーの第1側縁部と第2側縁部とを定め、前記末端側の端部がセンサー読取装置に挿入されるよう構成および配置された第1基板と、

(b) 前記第1基板の上方に配置される第2基板と、

(c) 前記第1および第2基板の間に配置され、前記センサーの前記第1側縁部に沿った第1孔、前記第2側縁部に沿った第2孔、および前記第1孔から第2孔にまで達する前記試料室を定めるスペーサーと、

(d) 前記第1および第2基板の少なくとも1つに配置された少なくとも1つの作用電極と、

(e) 前記第1および第2基板の少なくとも1つに配置された少なくとも1つの対電極と、

(f) 前記第1および第2基板のいずれかに1つに配置され、前記試料室がいつ試料を収容したかを測定するため、前記試料室を基準にして配置された少なくとも1つの指示電極とを備え

前記少なくとも1つの作用電極と前記少なくとも1つの対電極は、分析物を含有する試料が前記試料室に配置されると分析物応答性信号が発生するように、前記試料室を基準にして配置されている、試料中における分析物濃度を測定するためのセンサー。

【請求項31】 作用電極と対電極とを含み、前記作用電極と前記対電極が任意に対向関係に配置された電極対と、

前記作用電極と前記対電極とに隣接する約1μL以下の体積の試料液を収容する大きさに設定された測定域を含み、任意に約1μL以下の体積の試料液を収容

する大きさに設定された試料室と、

前記試料室内に配置された拡散性酸化還元媒介剤と、

センサー内に配置され、前記測定域が試料を収容したことを知らせ、かつ前記分析物の電気分解を助ける指示電極とを備えた分析物濃度を測定するためのセンサー。

【請求項 3 2】 前記測定域への試料の充填が開始されたことを知らせる第1の指示電極と、前記測定域が試料で満たされたことを知らせる第2の指示電極とを備えた請求項 3 0 および 3 1 のいずれか 1 項に記載のセンサー。

【請求項 3 3】 前記作用電極が配置された第1基板と、

前記対電極が配置された第2基板と、

前記第1基板上に配置され、前記作用電極に電気的に接続された作用電極コンタクトパッドと、

前記第2基板上に配置され、前記対電極に電気的に接続された対電極コンタクトパッドと、

前記指示電極に電気的に接続された指示電極コンタクトパッドとをさらに備え、

前記指示電極および前記指示電極コンタクトパッドが、前記第1および第2基板のいずれか1つに配置され、前記指示電極コンタクトパッドが、前記作用電極コンタクトパッドおよび前記対電極コンタクトパッドのいずれか1つに近接して配置され、

前記作用電極コンタクトパッド、前記対電極コンタクトパッド、および前記指示電極コンタクトパッドが、測定器との電気的な接続のため、前記第1および第2基板によって定められる露出した切欠き領域を有する請求項 3 1 および 3 2 のいずれか 1 項に記載のセンサー。

【請求項 3 4】 センサー内に配置された少なくとも2つの指示電極を備え、前記2つの指示電極は、第1の対／指示電極と第2の対／指示電極とを含み、前記対電極が前記第1および第2の対／指示電極間に配置されている請求項 3 0 ～ 3 3 のいずれか 1 項に記載のセンサー。

【請求項 3 5】 請求項 1 ～ 3 4 のいずれか 1 項に記載の電気化学センサーに

試料を接触させる工程と、

前記拡散性酸化還元媒介剤によって発生するバックグラウンド信号が平均的な生理学的正常量の分析物の酸化または還元によって発生する信号の5倍以下となるように、前記作用電極でセンサー信号を発生させる工程と、

前記センサー信号を用いて前記分析物の濃度を測定する工程とを含む、試料中の分析物濃度を測定する方法。

【請求項36】 前記分析物の濃度測定が、前記センサー信号を用いたクロメトリーによる分析物の濃度測定を含む請求項35に記載の方法。

【請求項37】 前記分析物の濃度測定が、前記センサー信号を用いたアンペロメトリーによる分析物の濃度測定を含む請求項35に記載の方法。

【請求項38】 前記分析物の濃度の測定が、前記センサー信号を用いたボテンシオメトリーによる分析物の濃度測定を含む請求項35に記載の方法。

【請求項39】 測定器具に一バッチの前記電気化学センサーに関する校正データを提供する工程をさらに含み、

前記校正データは前記一バッチの電気化学センサーにおけるバックグラウンド電荷の大きさに関する情報を含み、

前記分析物の濃度を測定する前記工程は、前記センサー信号および前記校正データを用いて前記分析物の濃度を測定することを含む請求項35～38のいずれか1項に記載の方法。

【請求項40】 試料を請求項5～12および30～34のいずれか1項に記載の電気化学センサーに接触させる工程と、

前記試料室が試料を有していることを示す指示電極からの信号を観察する工程と、

前記作用電極と前記対電極との間に電位を印加し、前記試料中の分析物を電気分解する工程と、

前記試料中の前記分析物の電気分解に応じ、前記センサーより分析物応答性信号を発生させる工程と、

前記分析物応答性信号を用いて前記分析物の濃度を測定する工程とを備えた試料中の分析物濃度を測定する方法。

【請求項 4 1】 (a) 第 1 基板上に複数の作用電極を形成することと、
(b) 第 2 基板上に複数の対電極を形成することと、
(c) 前記第 1 および第 2 基板のいずれか 1 つにスペーサー層を配置すること
と、
(d) 前記スペーサー層の一部分を除去して試料室領域を定めることと、
(e) 前記第 1 および第 2 基板を張り合わせることと、
(f) 張り合わせた前記基板より、前記作用電極の少なくとも 1 つ、前記対電
極の少なくとも 1 つ、および前記試料室領域の少なくとも 1 つをそれぞれ備えた
複数の電気化学センサーを分離させることとを含む、請求項 1 ~ 3 4 のいずれか
1 項に記載の電気化学センサーの製造方法。

【請求項 4 2】 前記第 1 基板が基板上の第 1 の領域であり、前記第 2 基板が
同基板上の第 2 の領域であり、さらに、

前記基板を折り曲げ、前記基板上の第 1 および第 2 領域を重ねることとを含む請
求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】 前記複数の電気化学センサーの分離には、第 1 および第 2 基
板を裁断し、前記電気化学センサーを分離させると共に、前記電気化学センサー
の前記試料室の少なくとも一端を定めることが含まれる請求項 4 1 ~ 4 2 のい
ずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 4】 前記第 1 および第 2 基板のいずれか 1 つに複数の指示電極を
形成することをさらに含む請求項 4 1 ~ 4 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 5】 前記スペーサー層を前記第 1 および第 2 基板のいずれか 1 つ
に配置した後に、前記スペーサー層の一部分を除去して、前記試料室を定める請
求項 4 1 ~ 4 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の分野】

本発明は、小体積試料中における生物学的分析物を検出するための分析センサーに関する。

【0002】

【発明の背景】

分析センサーは、化学ならびに医学の分野において、生物学的分析物の存在および濃度の測定に有用である。このようなセンサーは、例えば、糖尿病患者におけるグルコースや臨床治療 (critical care events) におけるラクテートを監視するのに必要である。

【0003】

現在利用可能な技術は、比較的大きい試料体積中の生物学的分析物を測定するものであり、例えば、一般に3マイクロリットル以上の血液または他の生体液が要される。これらの液体試料は、例えば、針や注射器を用いて患者から採取されるか、あるいは、指先等の皮膚の一部を切開し、その部位を「搾出 (milking)」して有効な試料体積を得ることによって患者から採取される。これらの処理は、頻繁に試料が必要となる場合には特に、患者にとって不便であり、しばしば痛みを伴う。神経末端密度の低い腕または腿の切開のように、より痛みの少ない試料採取の方法が知られている。しかしながら、身体の好ましい領域を切開することによって得られる血液試料は、これらの領域にはそれほど多くの近表面毛細血管が存在しないため、通常、1マイクロリットル未満 (submicroliter) である。

【0004】

したがって、小体積の試料中における分析物濃度の正確で感度の高い分析の実行を可能にする、比較的痛みが少なく、容易に使用できる血液分析物センサーの開発が所望され、またそれは非常に有益である。試料中の分析物を電気化学的に測定し得るセンサーが、当該技術分野で知られている。当該技術分野で公知なセンサーのいくつかには、少なくとも2つの電極が用いられ、さらに電気化学反応を補助する酸化還元媒介剤が含まれていることもある。しかしながら、小体積の

分析物の測定に電気化学センサーを用いると、測定結果に誤差が生じる。ある種の不正確性は、拡散性酸化還元媒介剤の使用に起因する。小体積センサーにおいては電極同士が非常に近接しているため、拡散性酸化還元媒介剤が作用電極と対電極との間を往復し、分析物として測定される信号が増す。小体積センサーにおける不正確性の他の原因是、少量の試料の体積を測定するのが困難であること、または、試料室が満たされたかどうかを測定するのが困難であることである。したがって、センサーおよび試料のサイズに起因する誤差を低減できる小体積電気化学センサーの開発が望まれている。

【0005】

[発明の要約]

本発明のセンサーは、1マイクロリットル未満の試料中における分析物を検出および定量する方法を提供する。本発明は、一般に、小体積試料中の分析物を、例えば、クロメトリー、アンペロメトリー、および／またはボテンシオメトリーによって分析する方法およびセンサーを含む。本発明のセンサーは、非浸出性または拡散性の酸化還元媒介剤を利用する。センサーは、試料を作用電極と電解的に接触させて保持する試料室をさらに備えている。多くの例において、センサーは、非浸出性または拡散性の第2の電子移動剤をさらに含有している。

【0006】

好ましい実施形態においては、作用電極が対電極と対向し、これら2つの電極間で試料室内に測定域を形成しており、この測定域は約1 μ L以下、好ましくは約0.5 μ L以下、より好ましくは約0.1 μ L以下の試料を収容できる大きさに設定されている。また、試料室および測定域を満たすのに要する試料の体積を低減するため、吸収材が試料室および測定域に任意に配置されている。

【0007】

本発明の一実施形態においては、1マイクロリットル未満の体積の試料中における生物学的分析物を正確かつ効率的に測定するため、クロメトリーによる電気化学的感知と非浸出性または拡散性の酸化還元媒介剤とを組み合わせたバイオセンサーが提供される。好適なセンサーは、電極と、電極上に存在する非浸出性または拡散性の酸化還元媒介剤と、試料を電極と電気的に接触させて保持する試

料室と、好ましくは、試料室の体積を低減するため試料室内に配置された吸収材とを備えている。試料室は、吸収材を備えた状態で、通常、約 $1 \mu\text{L}$ 以下、好ましくは約 $0.5 \mu\text{L}$ 以下、より好ましくは約 $0.25 \mu\text{L}$ 以下、最も好ましくは約 $0.1 \mu\text{L}$ 以下の試料体積の分析が行える大きさに設定される。いくつかの例においては、上記センサーは、非浸出性または拡散性の第2の電子移動剤をさらに含有する。

【 0 0 0 8 】

本発明の一実施形態は、まず試料を電気化学センサーに接触させ、次に分析物の濃度を測定することによって、試料中の分析物濃度を測定する方法を含む。電気化学センサーは、作用電極と対電極とを含む対向電極対と、これら2つの電極間に配置された、測定域を含む試料室とを備えている。測定域は、約 $1 \mu\text{L}$ 以下の試料を収容する大きさに設定されている。

【 0 0 0 9 】

本発明は、さらに、2以上の対向電極対を備えた電気化学センサーを含む。各電極対は、作用電極と、対電極と、これら2つの電極間に存在する測定域とを有し、測定域は約 $1 \mu\text{L}$ 以下の試料を保持する大きさとされている。さらに、センサーは、少なくとも1つの電極対の作用電極上に存在する非浸出性の酸化還元媒介剤、あるいは、試料室表面または試料中に存在する拡散性の酸化還元媒介剤をさらに備えている。

【 0 0 1 0 】

本発明の一態様は、試料を電気化学センサーに接触させ、分析物濃度をクロマトリーで測定することによって、試料中の分析物濃度を測定する方法である。電気化学センサーは、作用電極と対電極とを含む電極対を備えている。センサーは、試料を作用電極と電解的に接触させて保持する試料室をさらに備えている。試料室を約 $1 \mu\text{L}$ 以下の試料を収容する大きさに設定するため、試料室内には、試料室を満たすのに要する試料の量を低減させるための吸収材が存在している。試料室は、非浸出性または拡散性の酸化還元媒介剤を収容し、非浸出性または拡散性の第2の電子移動剤を任意に収容する。

【 0 0 1 1 】

センサーは、測定域または試料室が満たされたことを確認するために使用できる、指示電極または第二電極対のような充填指示器を備えていてもよい。また、指示電極または第二電極対は、分析物濃度測定の正確さを向上させるために使用することもできる。センサーは、分析物の酸化または還元速度を速めるため、測定域または試料室を加熱する加熱エレメントをさらに備えていてもよい。

【0012】

センサーは、側面充填式または頂部充填式のいずれにも構成できる。さらに、いくつかの実施形態においては、センサーを、一体型の試料採取および分析物測定装置の一部としてもよい。一体型の試料採取および分析物測定装置は、装置を用いて使用者の皮膚を穿孔し、血液等の液体試料を流出させてセンサーに収集することができるよう、センサーと皮膚穿孔部材とを備えていてもよい。少なくともいくつかの実施形態においては、液体試料は、一体型の試料採取および分析物測定装置を動かすことなく収集できる。

【0013】

上述のようなセンサーを形成する一方法には、第1基板上に少なくとも1つの作用電極を形成し、第2基板上に少なくとも1つの対電極または対／参照電極を形成することが含まれる。スペーサー層を、第1基板または第2基板のいずれかの上に配置する。センサー完成時には、試料が導入され保持される溝がこのスペーサー層により定められる。酸化還元媒介剤および／または第2の電子移動剤は、第1基板または第2基板上の、センサー完成時に溝内に露出する領域に配置されている。次に、第1基板と第2基板とを寄せ合い、スペーサー層によって両者を離間すると、上記溝により、少なくとも1つの作用電極および少なくとも1つの対電極または対／参照電極への通路が提供される。いくつかの実施形態においては、第1基板または第2基板は、単一シートまたは連続したウェップ材料の一部分である。

【0014】

本発明を特徴づけるこれらの特徴および他の様々な特徴は、添付のクレームによって特に指摘される。本発明、その利点、ならびにその使用によって達成される目的への理解を深めるため、本発明の好ましい実施形態を図示および説明して

いる図面と添付の明細書とを参照すべきである。

【 0 0 1 5 】

【 図面の簡単な説明 】

図面を参照する上で、同一の参照符号ならびに文字は、各図において対応する構造を示すものである。

【 0 0 1 6 】

図 1 は、互いに対向する作用電極および対電極を備えた、本発明の原理に基づく電気化学センサーの第 1 の実施形態を示した概略図である。

【 0 0 1 7 】

図 2 は、同一平面上に構成された作用電極および対電極を備えた、本発明の原理に基づく電気化学センサーの第 2 の実施形態を示した概略図である。

【 0 0 1 8 】

図 3 は、互いに対向する作用電極および対電極と、伸張した試料室とを備えた、本発明の原理に基づく電気化学センサーの第 3 の実施形態を示した概略図である。

【 0 0 1 9 】

図 4 は、酸化還元媒介剤、試料室、および電極の相対位置を示す、図 1 または 3 のセンサーの一部についての、縮尺を考慮しない (not-to-scale) 側断面図である。

【 0 0 2 0 】

図 5 は、複数の作用電極を備えた、本発明の原理に基づく電気化学センサーの第 4 の実施形態を示した平面図である。

【 0 0 2 1 】

図 6 は、試料採取手段と図 4 のセンサーとを備えた、本発明の原理に基づく分析物測定装置の一実施形態を示した斜視図である。

【 0 0 2 2 】

図 7 は、第 2 の電子移動剤としてグルコースオキシダーゼを備えた図 1 のセンサーを用いて、電解質の緩衝溶液（黒丸）または血清溶液（白丸）中における既知量のグルコースを電気酸化するのに必要な電荷を示したグラフである。

【0023】

図8は、図7のデータ（緩衝溶液のみ）に関する平均グルコース濃度を、平均値に適合するように算出した検量線によって示したグラフである。線形の検量線は、10～20mMの濃度に対して算出したものであり、二次多項式の検量線は、0～10mMの濃度に対して算出したものである。

【0024】

図9は、図7のグルコース測定値の臨床的な適合性を分析する、クラーク型臨床グリッド（Clark-type clinical grid）である。

【0025】

図10は、第2の電子移動剤としてグルコースデヒドロゲナーゼを備えた図1のセンサーを用いて、電解質の緩衝溶液中における既知量のグルコースを電気酸化するのに要する電荷のグラフである。

【0026】

図11A、11Bおよび11Cは、重なり合う本発明の作用電極と対電極の、3通りの形態を示した平面図である。

【0027】

図12Aおよび12Bは、基材の凹部を用いて形成された、本発明の電極対の一実施形態を示した断面図である。

【0028】

図13Aおよび13Bは、基材の凹部内に形成された、本発明の電極対の別の実施形態を示した断面図である。

【0029】

図14Aおよび14Bは、基体の凹部および吸収材を用いて形成された、本発明の電極対のさらに別の実施形態を示した断面図である。

【0030】

図15は、拡散性酸化還元媒介剤を有するセンサーにより運搬される電荷を、複数のグルコース濃度に関し、時間の経過と共に示したグラフである。

【0031】

図16は、拡散性酸化還元媒介剤を有するセンサーにより運搬される電荷を、

複数のグルコース濃度に関して示したグラフである。

【 0 0 3 2 】

図 17 は、拡散性酸化還元媒介剤の量が異なる複数のセンサーにより運搬される電荷を、時間の経過と共に示したグラフである。

【 0 0 3 3 】

図 18 A は、本発明の第 5 実施形態のセンサーに使用される作用電極を有する第 1 フィルムの正面図である。

【 0 0 3 4 】

図 18 B は、図 18 A に示した第 1 フィルムに配置するスペーサーの正面図である。

【 0 0 3 5 】

図 18 C は、図 18 B のスペーサーおよび図 18 A の第 1 フィルムの上に配置する、対電極を有する第 2 フィルムの底面図（図 18 A および 18 B に対する表裏反転図）である。

【 0 0 3 6 】

図 19 A は、本発明の第 6 実施形態のセンサーに使用される作用電極を有する第 1 フィルムの正面図である。

【 0 0 3 7 】

図 19 B は、図 19 A に示した第 1 フィルムに配置するスペーサーの正面図である。

【 0 0 3 8 】

図 19 C は、図 19 B のスペーサーおよび図 19 A の第 1 フィルムの上に配置する、対電極を有する第 2 フィルムの底面図（図 19 A および 19 B に対する表裏反転図）である。

【 0 0 3 9 】

図 20 A は、本発明の第 7 実施形態のセンサーに使用される作用電極を有する第 1 フィルムの正面図である。

【 0 0 4 0 】

図 20 B は、図 20 A に示した第 1 フィルムに配置するスペーサーの正面図で

ある。

【 0 0 4 1 】

図 2 0 C は、図 2 0 B のスペーサーおよび図 2 0 A の第 1 フィルムの上に配置する、対電極を有する第 2 フィルムの底面図（図 2 0 A および 2 0 B に対する表裏反転図）である。

【 0 0 4 2 】

図 2 1 A は、本発明の第 8 実施形態のセンサーに使用される作用電極を有する第 1 フィルムの正面図である。

【 0 0 4 3 】

図 2 1 B は、図 2 1 A に示した第 1 フィルムに配置するスペーサーの正面図である。

【 0 0 4 4 】

図 2 1 C は、図 2 1 B のスペーサーおよび図 2 1 A の第 1 フィルムの上に配置する、対電極を有する第 2 フィルムの底面図（図 2 1 A および 2 1 B に対する表裏反転図）である。

【 0 0 4 5 】

図 2 2 A は、本発明の第 9 実施形態のセンサーに使用される作用電極を有する第 1 フィルムの正面図である。

【 0 0 4 6 】

図 2 2 B は、図 2 2 A に示した第 1 フィルムに配置するスペーサーの正面図である。

【 0 0 4 7 】

図 2 2 C は、図 2 2 B のスペーサーおよび図 2 2 A の第 1 フィルムの上に配置された対電極を有する第 2 フィルムの底面図（図 2 2 A および 2 2 B に対する表裏反転図）である。

【 0 0 4 8 】

図 2 3 A は、本発明の第 10 実施形態のセンサーに使用される作用電極を有する第 1 フィルムの正面図である。

【 0 0 4 9 】

図 23 B は、図 23 A に示した第 1 フィルムに配置するスペーサーの正面図である。

【 0 0 5 0 】

図 23 C は、図 23 B のスペーサーおよび図 23 A の第 1 フィルムの上に配置する、対電極を有する第 2 フィルムの底面図（図 23 A および 23 B に対する表裏反転図）である。

【 0 0 5 1 】

図 24 A は、本発明の第 11 実施形態のセンサーに使用される作用電極を有する第 1 フィルムの正面図である。

【 0 0 5 2 】

図 24 B は、図 24 A に示した第 1 フィルムに配置するスペーサーの正面図である。

【 0 0 5 3 】

図 24 C は、図 24 B のスペーサーおよび図 24 A の第 1 フィルムの上に配置する、対電極を有する第 2 フィルムの底面図（図 24 A および 24 B に対する表裏反転図）である。

【 0 0 5 4 】

図 25 は、本発明の電気化学センサーの第 12 実施形態を示した正面図である

【 0 0 5 5 】

図 26 は、一体型の試料採取および分析物測定装置の一実施形態を示した斜視図である。

【 0 0 5 6 】

図 27 は、本発明の電気化学センサーの第 13 実施形態を示した断面図である

【 0 0 5 7 】

図 28 は、被験者の腕より収集した血液試料中の分析物濃度の本発明のセンサーによる測定値を、標準的な血液テストによる測定値と比較したグラフである。

【 0 0 5 8 】

図29は、被験者の指より収集した血液試料中の分析物濃度の本発明のセンサーによる測定値を、標準的な血液テストによる測定値と比較したグラフである。

【0059】

図30は、静脈血試料中の分析物濃度の本発明のセンサーによる測定値を、標準的な血液テストによる測定値と比較したグラフである。

【0060】

図31Aは、本発明のセンサー構成部品のシートの一実施例を示した正面図である。

【0061】

図31Bは、本発明のセンサー構成部品のシートの別の実施例を示した正面図である。

【0062】

図32は、測定器内に配置された本発明のセンサーを、測定器内部より見た状態を示した断面図である。

【0063】

〔好ましい実施形態の詳細な説明〕

本明細書においては、以下の定義によって記載の用語を定義する。

【0064】

「空気酸化可能な媒介剤」とは、固体または液体のいずれかの状態で空气中で保管された場合に、例えば、1ヶ月以下、好ましくは1週間以下、より好ましくは1日以下の期間内に、少なくとも90%が空気によって酸化される酸化還元媒介剤である。

【0065】

「アンペロメトリー」には、定常状態のアンペロメトリー、クロノアンペロメトリー、およびコットトレル型測定が含まれる。

【0066】

「生体液」は、分析物の測定が可能なあらゆる体液であり、例えば、血液、間隙液(interstitial fluid)、皮膚液(dermal fluid)、汗および涙である。

【0067】

本発明の文脈において「血液」という用語は、全血と、無細胞成分、すなわち血漿および血清とを含む。

【0068】

「クロメトリー」とは、電極上で直接起こるか、または1以上の電子移動剤を介して起こる分析物の完全またはほぼ完全な電気分解の間に、通過または通過すると考えられる電荷の測定である。電荷は、分析物の部分的またはほぼ完全な電気分解の間に移動する電荷を測定することより、または、しばしば、減衰電流および経過時間を電気分解中に多重測定することによって測定される。減衰電流は、電気分解される種の濃度が電気分解により低下することに起因する。

【0069】

「対電極」とは、作用電極と対をなす1以上の電極であって、作用電極を流れる電流と大きさが同等で、符号が反対の電気化学的な電流が流れる電極を指す。「対電極」との用語には、参照電極としても機能する対電極（すなわち、対／参照電極）が、「対電極」には参照電極または対／参照電極が含まれない旨が記載されていない限り、含まれるものとする。

【0070】

「有効拡散係数」とは、電気化学セルの電極間の体積における、例えば、分析物、酵素、または酸化還元媒介剤のような物質の輸送を特徴づける拡散係数である。少なくともいくつかの例においては、セル体積は、1を超える媒体（例えば、試料流体およびポリマー膜）に占められている。各媒体を介した物質の拡散は、異なる速度で起こる。有効拡散係数は、この複数の媒体の体積を通過する拡散速度に相当し、通常、試料液のみによって満たされたセルにおける物質の拡散係数とは相違する。

【0071】

「電気化学センサー」とは、電気化学的な酸化還元反応によって、分析物の存在の検出および／または分析物濃度の測定を行うように構成された装置である。この反応は、分析物の量または濃度と相関する電気信号に変換される。

【0072】

「電気分解」とは、電極上で直接起こるか、1以上の電子移動剤（例えば、酸

化還元媒介剤および／または酵素) を介して起こる、化合物の電気酸化または電気還元である。

【 0 0 7 3 】

「対向する電極」との用語は、作用電極の作用面が対電極の表面とほぼ対向するように配置されているような、作用電極および対電極の配置を指す。少なくともいくつかの例においては、作用電極と対電極との間の距離が、作用電極の作用面の幅よりも短い。

【 0 0 7 4 】

化合物は、表面に取り込まれるか (entrapped) 、または化学結合した場合、表面上に「固定化」される。

【 0 0 7 5 】

「指示電極」は、試料室および／または測定域が部分的または完全に満たされたことを検出する 1 以上の電極を含む。

【 0 0 7 6 】

「層」は、1 以上の層を含む。

【 0 0 7 7 】

「測定域」は、本明細書中では、分析物アッセイで分析されるべき (to be interrogated) 試料の部分のみを収容する大きさに形成された、試料室の領域と定義される。

【 0 0 7 8 】

「不拡散性」、「非浸出性」または「非放出性 (non-releasable)」の化合物とは、分析物アッセイの期間中、作用電極の作用面から実質的に拡散しない化合物である。

【 0 0 7 9 】

「対／参照電極の電位」とは、セル中の溶液が pH 7 の 0.1 M の NaCl 溶液である場合における、セルの参照電極または対／参照電極のハーフセル電位である。

【 0 0 8 0 】

「ボテンシオメトリー」および「クロノボテンシオメトリー」とは、時間当た

りに 1 以上のポイントで電位差計による測定を行うことを指す。

【 0 0 8 1 】

「酸化還元媒介剤」とは、分析物と作用電極との間で、直接または第 2 の電子移動剤を介して電子を運搬する電子移動剤である。

【 0 0 8 2 】

「参照電極」には、対電極としても機能する参照電極（すなわち、対／参照電極）が、「参考電極」には対／参照電極を含まれない旨が記載されていない限り、含まれるものとする。

【 0 0 8 3 】

「第 2 の電子移動剤」は、酸化還元媒介剤と分析物との間で電子を運搬する分子である。

【 0 0 8 4 】

「吸収材」とは、液体試料を吸上げ、保持し、かつ／または液体試料で湿らされる材料であって、一般に、分析物の電極への拡散を実質的に妨げない材料を指す。

【 0 0 8 5 】

「試料室内の表面」とは、作用電極、対電極、対／参照電極、参照電極、指示電極、スペーサーの各面、または試料室に結合しているその他のあらゆる表面を含む。

【 0 0 8 6 】

「作用電極」とは、分析物が、酸化還元媒介剤の作用により、または作用なしに、電気酸化または電気還元される電極を指す。

【 0 0 8 7 】

「作用面」とは、非浸出性酸化還元媒介剤で被覆され、かつ試料に露出している作用電極の部分である。また、酸化還元媒介剤が拡散性の場合、「作用面」は、試料に露出している作用電極の部分である。

【 0 0 8 8 】

本発明の小体積生体外分析物センサーは、試料において、約 1 μ L 以下、好ましくは約 0.5 μ L 以下、さらに好ましくは 0.25 μ L 以下、最も好ましくは

0. 1 μ L 以下の体積を有する部分の分析物濃度を測定するように設計されている。対象となる分析物は、一般に、血液または血清といった溶液または生体液として提供される。図面全般、特に図1～4を参照すると、本発明の小体積生体外電気化学センサー20は、通常、作用電極22、対電極（対／参照電極）24、および試料室26（図4参照）を備えている。試料室26は、試料が室内に供給されると、試料が作用電極22と対電極24の両方に電解的に接触するように構成されている。これにより、電流が電極間を流れ、分析物の電気分解（電気酸化または電気還元）が引き起こされる。

【0089】

（作用電極）

作用電極22は、成形された炭素繊維複合体で形成することもできるし、または、ポリエステルのような不活性の非導電性基体上に適当な導電層を堆積させたもので構成することもできる。導電層は、一般に、比較的低い電気抵抗を有し、また作動中のセンサー電位範囲においては、一般に、電気化学的に不活性である。好適な導電層としては、金、炭素、白金、二酸化ルテニウム、パラジウム、および例えばECCOCOAT CT5079-3炭素充填導電性エボキシコーティング（W.R. Grace Company, Woburn, Massachusettsより入手可能）のような導電性エボキシ、ならびに当業者に公知の他の不腐食性材料が挙げられる。電極（例えば、導電層）は、蒸着または印刷といった方法で、不活性物質の表面上に堆積される。

【0090】

また、電圧供給源または電流測定装置といった外部電子機器（図示せず）への電極の接続を容易にするため、作用電極22の端部にタブ23を設けてもよい。また、作用電極22と外部電子機器との接続には、他の公知の方法または構造（コンタクトパッド等）を用いてもよい。

【0091】

電気化学反応が作用電極の媒介剤で被覆されていない部分で生じることを防ぐため、非浸出性の媒介剤を用いる場合には、図4に示すように、誘電体40を、電極上の酸化還元媒介剤が存在する領域の上方、下方、または周囲に配置するこ

とができる。好適な誘電体材料としては、ろうおよびポリエチレンのような非導電性有機ポリマーが挙げられる。誘電体 40 はまた、電極上の酸化還元媒介剤の一部を被覆していてもよい。酸化還元媒介剤に被覆された部分は試料と接触せず、したがって、電極の作用面の一部にはならない。

【 0 0 9 2 】

(感知化学作用)

作用電極 22 に加え、分析物の分析を行う感知化学作用物質 (sensing chemistry materials) を試料室 26 に設ける。この感知化学作用には、酸化還元媒介剤および第 2 の電子移動剤が関与していることが好ましいが、場合によっては、いずれか一方または他方を単独で用いてもよい。酸化還元媒介剤および第 2 の電子移動剤は、それぞれ個別に拡散性または非浸出性 (すなわち、不拡散性) とすることができる、例えば、何れか一方もしくは両方が拡散性または非浸出性であってもよい。センサー化学作用成分の配置は、各成分が拡散性か非浸出性か次第で決定してもよい。例えば、非浸出性および／または拡散性の成分は、一般に、作用電極上に感知層を形成する。あるいは、1 以上の拡散性の成分を、試料の導入前に、試料室内のいずれかの面に配置してもよい。他の例として、1 以上の拡散性の成分を、センサーへの試料の導入前に、試料中に配してもよい。

【 0 0 9 3 】

酸化還元媒介剤が非浸出性である場合、非浸出性酸化還元媒介剤は、一般に、感知層 32 として作用電極 22 上に配置される。酸化還元媒介剤と第 2 の電子移動剤とを有する実施形態において、酸化還元媒介剤および第 2 の電子移動剤が共に非浸出性である場合、これらの非浸出性成分は、いずれも感知層 32 として作用電極 22 上に配置される。

【 0 0 9 4 】

例えば、第 2 の電子移動剤が拡散性で、酸化還元媒介剤が非浸出性である場合には、少なくとも酸化還元媒介剤を、感知層 32 として作用電極 22 上に配置する。拡散性の第 2 の電子移動剤は、作用電極の感知層上に配置する必要はなく、酸化還元媒介剤感知層内を含む、試料室のいずれかの面に配置するか、または試料中に配置することができる。酸化還元媒介剤が拡散性である場合、酸化還元媒

介剤を試料室のいずれかの面に配置するか、または試料中に配することが可能である。

【 0 0 9 5 】

酸化還元媒介剤および第2の電子移動剤の両方が拡散性である場合、これら拡散性の成分を、それぞれ個別に、または一緒に試料室内のいずれかの面に配置するか、および／または試料中に配してもよい（すなわち、各拡散性成分を、試料室の同一面上に配置したり、または試料中に配する必要はない）。

【 0 0 9 6 】

酸化還元媒介剤は、拡散性であっても非浸出性であっても、作用電極と分析物との間に電流を流れさせ、電極上での直接的な電気化学的反応に適さない分子の電気化学的分析を可能にする。媒介剤は、電極と分析物との間で、電子移動剤として機能する。

【 0 0 9 7 】

一実施形態において、酸化還元媒介剤および第2の電子移動剤は拡散性であり、試料室の同一面、例えば、作用電極上に配置されている。これと同じ条件 (ven)において、両方を、例えば、対電極、対／参照電極、参照電極、または指示電極上に配置することができる。他の例においては、酸化還元媒介剤および第2の電子移動剤の両方が拡散性であり、試料室の面および／または試料中に個別に配置されている。例えば、酸化還元媒介剤を作用電極上に配置し、一方、第2の電子移動剤を、作用電極を除くいずれかの面または試料中に配置することができる。同様に、第2の電子移動剤を作用電極上に配置し、酸化還元媒介剤を、作用電極を除くいずれかの面に配置するか、または試料中に配するという、上記とは逆の状態も、好適な実施形態である。他の例として、酸化還元媒介剤を対電極上に配置し、第2の電子移動剤を、対電極を除くいずれかの面または試料中に配することができる。これと逆の状態もまた、好適である。

【 0 0 9 8 】

拡散性の酸化還元媒介剤および／または第2の電子移動剤は、急速に試料中に拡散してもよいし、また時間をかけてゆっくりと拡散してもよい。同様に、拡散性の酸化還元媒介剤および／または第2の電子移動剤は、固体の状態で配置され

た面から溶解し、次に、拡散性の酸化還元媒介剤および／または第2の電子移動剤が急速にまたは時間をかけて試料中に拡散してもよい。酸化還元媒介剤および／または第2の電子移動剤が時間をかけて拡散する場合、酸化還元媒介剤および／または第2の電子移動剤が拡散できるよう、使用者に分析物濃度を測定するまでに時間をおくよう指示を与えてよい。

【 0 0 9 9 】

[バックグラウンド信号]

少なくともいくつかの例において、拡散性酸化還元媒介剤は、分析物が存在しない場合でも、作用電極から対電極までの間を前後に往復することがある。これにより、一般に、バックグラウンド信号が発生する。クロメトリーによる測定に関し、このバックグラウンド信号を「 Q_{back} 」と称する。バックグラウンド信号は、分析物不在の電気化学的アッセイにおいて通過した電荷に相当する。バックグラウンド信号は、一般に、過渡成分と定常状態成分の両方を有している。過渡成分の少なくとも一部は、例えば、ある特定の酸化状態における、媒介剤の濃度勾配の確立に起因することがある。定常状態成分の少なくとも一部は、例えば、作用電極と対電極または対／参照電極との間を往復（shuttling）する酸化還元媒介剤に起因することがある。往復とは、酸化還元媒介剤が作用電極で電気酸化（または電気還元）され、次に対電極または対／参照電極で電気還元（または電気酸化）され再度作用電極で電気酸化（または電気還元）され得る状態とされ、酸化還元媒介剤が電気酸化と電気還元とを繰り返すようになることを指す。

【 0 1 0 0 】

酸化還元媒介剤の往復量、したがってバックグラウンド信号の定常状態成分は、例えば、酸化還元媒介剤の有効拡散係数、試料の粘度、試料の温度、電気化学セルの寸法、作用電極と対電極または対／参照電極との間の距離、および作用電極と対電極または対／参照電極との間の角度によって変化する。

【 0 1 0 1 】

いくつかの例において、バックグラウンド信号の定常状態成分は、(a) 例えば、試料の温度、試料の粘度、またはアッセイ期間中にバックグラウンド信号が依存するあらゆる他のパラメータの可変性、(b) 例えば、作用電極と対電極ま

たは対／参照電極との不均一な離間、電極ジオメトリの変動、または作用電極、対電極、および／または対／参照電極からの突出量のような、電気化学セルの不完全度 (imperfections) が関与するノイズを含むことがある。

【 0 1 0 2 】

バックグラウンド信号の定常状態成分は再生可能な場合もあるが、あらゆるノイズは、本質的に再生可能ではない。この結果、ノイズは正確さに悪影響を及ぼす。場合によっては、バックグラウンド信号とノイズとが互いに関連している。この結果、ノイズおよびノイズによって誘発される誤差を、バックグラウンド信号を減少させることによって低減することができる。例えば、作用電極と対電極または対／参照電極との間における媒介剤の往復を減少させることにより、酸化還元媒介剤の拡散に影響を及ぼす試料温度や粘度の変化が関与するノイズを減少させることができると考えられる。

【 0 1 0 3 】

したがって、バックグラウンド信号の減少に伴いノイズも減少するこれらの例においては、測定の正確さを向上させるか、または測定値の誤差を低減するため、バックグラウンド信号を 0 近くまで抑えることが望ましい。少なくともいくつかの例においては、バックグラウンド信号の大きさが、分析物量の電気分解によって発生する信号の大きさの 5 倍を上回らないようにセンサーを構成している。バックグラウンド信号が、分析物の電気分解によって発生する信号の 200%、100%、50%、25%、10%、または 5% を上回らないことが好ましい。アンペロメトリーの場合、分析物の電気分解によって発生する電流に対する酸化還元媒介剤の往復による電流の比率を測定することにより、この比較が行える。ボテンシオメトリーの場合、酸化還元媒介剤の往復により発生する電位測定値ならびに分析物の電気分解によって発生する電位測定値を確定することにより、この比較が行える。クーロメトリーの場合、酸化還元媒介剤の往復により作用電極に移動した電荷ならびに分析物の電気分解によって作用電極に移動する電荷を測定することにより、この比較が行える。

【 0 1 0 4 】

バックグラウンド信号の大きさを、分析物の所定量と比較してもよい。試料中

の分析物の所定量は、例えば、分析物の予想または平均モル量としてもよい。予想または平均モル量は、例えば、使用者または個人における平均値；母集団における平均値；正常な生理学的範囲の最大値、最小値、または平均値；母集団における生理学的最大値または最小値；使用者または個人における生理学的最大値または最小値；使用者、個人、または母集団における正常な生理学的範囲値外の平均偏差、最大偏差、または最小偏差；母集団における平均値を上回るか、または下回る偏差；あるいは、使用者または個人における正常な生理学的平均値を上回るか、または下回る最大偏差または最小偏差として決定することができる。また、母集団は、例えば、健康状態や性別によって、または、例えば、正常な成人、小児、または新生児の母集団のように年齢によって定めてもよい。健康状態によって母集団を定める場合、母集団には、特定の条件を欠いている人々、あるいは、例えば糖尿病のような特定の条件を有する人々が含まれていてもよい。例えばティーツテキストブックオブクリニカルケミストリー、付録 (2175~2217 頁) 第 2 編、カール. エー. バティスおよびエドワード. アール. アシュウッド編、ダブリュ. ビー. サンダース コー.、フィラデルフィア、1994 年 (Tietz Textbook of Clinical Chemistry, Appendix (pp. 2175-2217) (2nd Ed., Carl A. Burtis and Edward R. Ashwood, eds., W.D. Saunders Co., Philadelphia 1994) (引照により本明細書に組み込まれる) に記載されているような、平均値または予想値に関する基準範囲 (reference interval) を指標基準として用いてもよいが、熟練の医師による検診または血液化学判定を用いて個人の平均値または予想値を決定してもよい。例えば、ティーツテキストブックオブクリニカルケミストリーによれば、成人は、絶食後、全血中に 6.5~9.5 mg/dL の濃度のグルコースを、または静脈全血中に 8.1~15.3 mg/dL の濃度の L-ラクテートを有する。成人における正常な生理学的平均濃度は、例えば、グルコースに関しては 8.0 mg/dL、L-ラクテートに関しては 1.2~1.7 mg/dL に相当するものと考えられる。他の例としては、若年型糖尿病を患っているが、血糖コントロール (glycemic control) が良好な人が挙げられ、グルコース濃度は約 5.0 mg/dL~4.00 mg/dL であり、よって平均モル量は 2.25 mg/dL である。さらに別の例において、糖尿病ではない成人は、約 8.0 mg/dL

dL(絶食後)～140mg/dL(食後)のグルコース濃度を有し、よって110mg/dLの平均モル量を有する。

【0105】

測定できる補足的な分析物としては、例えば、アセチルコリン、アミラーゼ、ビリルビン、コレステロール、絨毛性性腺刺激ホルモン、クレアチニナーゼ(例えば、CK-MB)、クレアチニン、DNA、フルクトースアミン、グルコース、グルタミン、成長ホルモン、ホルモン、ケトン、ラクテート、パーオキシド、前立腺特異性抗原、プロトロンビン、RNA、甲状腺刺激ホルモン、およびトロボニンが挙げられる。例えば、抗生物質(例えば、ゲンタマイシン、パンコマイシン等)、ジギトキシ、ジゴキシン、乱用薬物(drugs of abuse)、テオフィリン、およびワルファリンのような薬物の濃度も測定できる。DNAおよび/またはRNAの濃度を測定するのに適したアッセイが、米国特許出願番号09/138,888、09/145,776、および米国特許仮出願番号60/090,517、60/093,100、60/114,919に開示されており、これらは引照をもって本明細書に組み込まれている。

【0106】

電気分解による分析物信号に対するバックグラウンド信号が特定の比率となつたセンサーを構成するため、酸化還元媒介剤の往復に起因するバックグラウンド信号および/または分析物の電気分解により発生する信号による電流および/または電荷に関与するいくつかのパラメータを考慮の上選択し、所望の比率を得てもよい。一般に、クーロメトリーによるアッセイにおいて測定される信号が電荷であるのに対し、アンペロメトリーによるアッセイにおいて測定される信号は、測定が行なわれた時点における電流である。電流および電荷はいくつものパラメータによって左右されるため、分析物の電気分解により発生する信号に対する酸化還元媒介剤の往復により発生するバックグラウンド信号の所望の比率は、種々のセンサー構成およびセンサーの操作方法によって達成できる。

【0107】

[バックグラウンド信号の制御]

バックグラウンド信号を制御する一方法として、a) pH 7 の 0.1M の Na

C 1 でのサイクリックボルタンメトリーによって測定した場合に、参照または対／参照電極の電位に対し、約 + 1 0 0 m V 以下の半波電位で分析物を酸化する酸化還元媒介剤、または b) pH 7 の 0 . 1 M の N a C l でのサイクリックボルタンメトリーによって測定した場合に、参照または対／参照電極の電位に対し、約 - 1 0 0 m V 以下の半波電位で分析物を還元する酸化還元媒介剤を用いることが挙げられる。適切な参照または対／参照電極（例えば、銀／塩化銀電極）を選択することができる。好ましくは、上記酸化還元媒介剤は、 a) pH 7 の 0 . 1 M の N a C l でのサイクリックボルタンメトリーによって測定した場合に、参照または対／参照電極の電位に対し、約 + 5 0 m V 以下、 + 2 5 m V 以下、 0 m V 以下、 - 2 5 m V 以下、 - 5 0 m V 以下、 - 1 0 0 m V 以下、または - 1 5 0 m V 以下の半波電位で分析物を酸化するか、または b) pH 7 の 0 . 1 M の N a C l でのサイクリックボルタンメトリーによって測定した場合に、参照または対／参照電極の電位に対し、約 - 5 0 m V 以上、 - 2 5 m V 以上、 0 m V 以下、 + 2 5 m V 以上、 + 5 0 m V 以上、 + 1 0 0 m V 以上、 + 1 5 0 m V 以上、または + 2 0 0 m V 以上の半波電位で分析物を還元する。あるいは、対電極によって酸化還元媒介剤を還元する場合、作用電極と参照または対／参照電極との間において、約 + 1 0 0 m V 以下、 + 5 0 m V 以下、 + 2 5 m V 以下、 0 m V 以下、 - 2 5 m V 以下、 - 5 0 m V 以下、 - 1 0 0 m V 以下、または - 1 5 0 m V 以下の付加電位 (applied potential) でセンサーを作動させる。また、対電極で酸化還元媒介剤を酸化する場合、作用電極と参照または対／参照電極との間において、約 - 1 0 0 m V 以上、 - 5 0 m V 以上、 - 2 5 m V 以上、 0 m V 以上、 + 2 5 m V 以上、 + 5 0 m V 以上、 + 1 0 0 m V 以上、 + 1 5 0 m V 以上、または + 2 0 0 m V 以下の付加電位でセンサーを作動させる。

【 0 1 0 8 】

バックグラウンド信号を制御する別の方法としては、電気酸化アッセイにおいて、酸化還元媒介剤が対電極または対／参照電極で容易に還元されないよう、あるいは電気還元アッセイにおいて、酸化還元媒介剤が対電極または対／参照電極で容易に酸化されないように付加電位を制御することが挙げられる。このことは、例えば電気酸化アッセイにおいては、参照または対／参照電極に対する電位が

、（参照電極に対する）対電極または対／参照電極の電位に対して負である拡散性酸化還元媒介剤を備えたセンサーを用いることにより達成できる。作用電極の（参照または対／参照電極に対する）電位は、酸化還元媒介剤が作用電極で酸化されるよう、酸化還元媒介剤に対しては正になるように選択され、対電極または対／参照電極に対しては負であってもよい。例えば、参照または対／参照電極に対して -200 mV の電位を有する拡散性酸化還元媒介剤によって分析物の電気酸化が媒介され、かつ作用電極が均衡状態となる電位が参照または対／参照電極に対して -150 mV であれば、酸化還元媒介剤は実質的に作用電極で酸化され、分析物を酸化する。さらに、酸化された酸化還元媒介剤の一部が対電極または対／参照電極に達しても、対／参照電極は酸化還元媒介剤の電位よりもはるかに正（すなわち、 150 mV ）に均衡されているため、酸化還元媒介剤は対／参照電極では容易に還元されない。

【 0 1 0 9 】

電気還元アッセイにおいては、参照電極または対／参照電極に対する見掛け電位が、対電極または対／参照電極の電位に対して正である拡散性酸化還元媒介剤を備えたセンサーを提供する。参照または対／参照電極に対する作用電極の電位は、酸化還元媒介剤が作用電極で還元されるよう、酸化還元媒介剤に対しては負になるように選択され、対電極または対／参照電極に対して正に均衡されてもよい。

【 0 1 1 0 】

バックグラウンド信号を制限するさらに別の方法としては、酸化還元媒介剤を、対電極または対／参照電極での反応時に、例えば、析出（precipitation）または重合により固定化することが挙げられる。例えば、媒介剤は酸化状態では陽イオン性かもしれないが、還元状態では中性でありはるかに溶解しにくい。対／参照電極での還元反応により、還元された中性の媒介剤が対／参照電極上に析出される。

【 0 1 1 1 】

バックグラウンド信号の制御に適した別のセンサー形態としては、分析物の予測または平均モル量と化学量的に同量か、またはそれより少ないモル量の酸化還

元媒介剤を備えたセンサーが挙げられる。分析物の予測または平均モル量は、既に述べたように決定できる。分析物の予測または平均モル量は、例えば、使用者または個人における平均値；母集団における平均値；正常な生理学的範囲の最大値、最小値、または平均値；母集団における生理学的最大値または最小値；使用者または個人における生理学的な最大値または最小値；使用者、個人、または母集団における正常な生理学的範囲値外の最大偏差または最小偏差；母集団の平均値を上回るか、または下回る偏差；あるいは、使用者または個人における正常な生理学的平均値を上回るか、または下回る最大偏差または最小偏差として決定することができる。母集団は、例えば、健康状態や性別によって、または、例えば、正常な成人、小児、または新生児の母集団のように年齢によって定めてもよい。健康状態によって母集団を定める場合、母集団には、特定の条件を欠いている人々、あるいは、例えば糖尿病のような特定の条件を有する人々が含まれていてもよい。例えば、上述のティーツテキストブックオブクリニカルケミストリーに記載されているような、平均または予想値に関連する基準範囲を指標基準として、用いてもよいが、検診または血液化学判定で平均値または予想値を決定してもよい。例えば、分析物の生理学的平均モル量は、試料を採取した人の健康状態や年齢に左右される。この決定は、熟練の医師の知識範囲内である。

【 0 1 1 2 】

分析物濃度と相関的な酸化還元媒介剤濃度を低下させることにより、酸化還元媒介剤の往復に起因する信号と相関的な、分析物に起因する信号が増加する。この方法を実行するにあたり、酸化還元媒介剤のモル量は、化学量論に基づき、分析物の予測または平均モル量の 50% 以下、20% 以下、10% 以下、または 5% 以下とすることができます。

【 0 1 1 3 】

このようなセンサー形態で使用する酸化還元媒介剤の量は、ある一定の範囲内とすべきである。範囲の上限は、例えば、酸化還元媒介剤の往復に起因する、許容可能な最大信号；例えば、セル寸法や電極の位置を含む電気化学セルのデザイン；酸化還元媒介剤の有効拡散係数；および、アッセイに要する時間の長さに基づいて決定することができる。さらに、酸化還元媒介剤の往復に起因する、許容

可能な最大信号は、例えば、アッセイが質的、半定量的、または定量的なものを見図しているかどうか、分析物濃度のわずかな差異が治療を変更する根拠となるかどうか、および分析物の予測濃度といった 1 以上のアッセイパラメータの結果、アッセイ毎に異なる。

【 0 1 1 4 】

使用する酸化還元媒介剤量を最小限にすることは有益であるが、酸化還元媒介剤の許容量の範囲には、通常、下限がある。使用できる酸化還元媒介剤の最小量は、望ましい測定時間内、例えば、約 5 分以内または約 1 分以内でアッセイを完了するために必要な酸化還元媒介剤濃度である。アッセイを完了するのに要する時間は、例えば、作用電極と対電極または対／参照電極との距離、酸化還元媒介剤の有効拡散係数、および分析物濃度によって左右される。いくつかの例においては、例えば、運動特性に対する制限 (kinetic limitations) が存在しない場合、すなわち、酸化還元媒介剤の往復が拡散のみに依存する場合、酸化還元媒介剤の最小濃度は下記の式によって求められる。

$$C_m = (d^2 C_s) / D_m t$$

式中、 C_m は媒介剤の最小所要濃度、 d は対向配置された作用電極と対電極または対／参照電極との間の距離、 C_s は試料中の平均分析物濃度、 D_m は試料中の媒介剤の有効拡散係数、 t は所望測定時間である。

【 0 1 1 5 】

例えば、対電極対間の距離が $50 \mu m$ 、測定分析物が 5 mM のグルコース、酸化還元媒介剤の有効拡散係数が $10^{-6} \text{ cm}^2/\text{秒}$ 、望ましい反応時間が 1 分以内である場合、最小酸化還元媒介剤濃度は 2.08 mM である。これらの条件の下で、バックグラウンド信号は、分析物の電気酸化によって生じる信号よりも少なくなる。

【 0 1 1 6 】

拡散性酸化還元媒介剤により発生するバックグラウンド電流を制限するさらに別のセンサー形態としては、対電極に向かう拡散性媒介剤の流れに対するバリヤを設けることが挙げられる。このバリヤは、例えば、酸化還元媒介剤がそれを介して拡散できないフィルムまたは酸化還元媒介剤がそれを介してゆっくりと拡散

するフィルムであつてよい。好適なフィルムの例としては、ポリカーボネート、ポリビニルアルコール、および再生セルロースまたはセルロースエステルの膜が挙げられる。あるいは、荷電もしくは極性の粒子、化合物、または官能基をバリヤに含有させ、中性に、またはより低く荷電された分析物の流れに相関的な、荷電酸化還元媒介剤の流れを防止または低減することもできる。酸化還元媒介剤が、以下に述べる多くのオスミウム酸化還元媒介剤と同様に正荷電である場合、メチル化ポリ(1-ビニルイミダゾール)のような正荷電または極性フィルムをバリヤとすることができます。酸化還元媒介剤が負荷電である場合、ナフィオン(Nafion:登録商標)のような負荷電または極性フィルムをバリヤとすることができます。好適な極性基質の例としては、双極性膜、アニオンポリマーと架橋したカチオンポリマーを有する膜等が挙げられる。いくつかの例において、対電極における拡散性酸化還元媒介剤の酸化または還元が、バリヤにより少なくとも25%、50%、または90%減少する。

【 0 1 1 7 】

バックグラウンド電流を制限するさらに別のセンサー形態としては、対電極上よりも作用電極上において、より容易に酸化または還元される酸化還元媒介剤を備えたセンサーが挙げられる。電極での酸化還元媒介剤の反応速度を、電極材料の作用とすることができます。例えば、いくつかの酸化還元媒介剤は、Ag/AgCl電極よりも、炭素電極でより速く反応する。電極を適切に選択すれば、一方の電極における反応速度を、もう一方の電極における反応速度よりもはるかに遅くすることができる。いくつかの例においては、対電極における拡散性酸化還元媒介剤の酸化または還元速度は、作用電極における反応速度に比べ、少なくとも25%、50%、または90%減速している。いくつかの例においては、例えば、過電位(overpotential)あるいは対電極または対/参照電極における反応速度を速める印加電位よりも高い電位を要する対電極または対/参照電極材料を選択することにより、対電極または対/参照電極における酸化還元媒介剤の反応速度を、制御した。

【 0 1 1 8 】

バックグラウンド電流を制限する別のセンサー形態としては、酸化還元媒介剤

の拡散の低減に適した素子が挙げられる。拡散は、例えば、拡散係数の比較的低い酸化還元媒介剤を用いるか、または測定域における試料粘度を高めることによって低減できる。別の実施形態においては、酸化還元媒介剤の拡散は、例えば、5,000ダルトン、好ましくは25,000ダルトン、より好ましくは100,000ダルトンを上回る高分子量の酸化還元媒介剤を選択することによって低減できる。

【 0 1 1 9 】

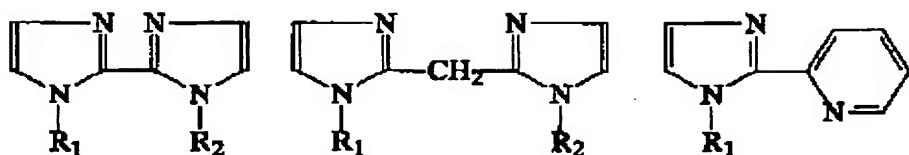
〔酸化還元媒介剤〕

あらゆる有機または有機金属酸化還元種が酸化還元媒介剤として使用可能であるが、好適な酸化還元媒介剤の一種は、遷移金属化合物または錯体である。好適な遷移金属化合物または錯体としては、オスミウム、ルテニウム、鉄およびコバルトの化合物または錯体が挙げられる。これらの錯体においては、遷移金属は1以上のリガンドに配位結合している。リガンドは、一般に、一座、二座、三座、または四座リガンドである。最も好ましいリガンドは、例えば、ピリジンおよび／またはイミダゾール誘導体のような複素環式窒素化合物である。多座リガンドには、複数のピリジンおよび／またはイミダゾール環が含まれていてもよい。あるいは、例えば、フェロセンのようなメタロセン誘導体を用いることも可能である。

【 0 1 2 0 】

好適な酸化還元媒介剤として、1以上のリガンドを有し、各リガンドが1以上の含窒素複素環を有するオスミウムまたはルテニウム遷移金属錯体が挙げられる。このようなりガンドの例としては、ピリジンおよびイミダゾール環と、例えば2,2'-ビピリジン、2,2':6',2''-ターピリジン、1,10-フェナントロリンのような、ピリジンおよび／またはイミダゾール環を2以上有するリガンド、ならびに下記の構造を有するリガンドおよびその誘導体が挙げられる。

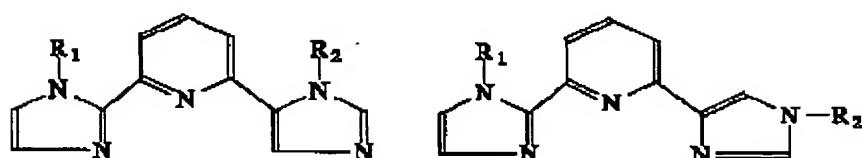
【化1】



(I)

(II)

(III)



(IV)

(V)

式中、R₁およびR₂は、それぞれ独立して水素、ヒドロキシ、アルキル、アルコキシ、アルケニル、ビニル、アリル、アミド、アミノ、ビニルケトン、ケト、または含硫黄基である。

【0121】

「アルキル」との用語には、例えば、メチル、エチルイソプロピル（1-メチルエチル）、ブチル、第三ブチル（1, 1-ジメチルエチル）等といった、1～6の炭素原子を有する直鎖状または分枝状の飽和脂肪族炭化水素鎖が含まれる。1～3の炭素原子を有する炭化水素鎖が好ましい。

【0122】

「アルコキシ」との用語には、上述のように定義したアルキルの構造の残存部に酸素原子が結合したもの、例えば、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ（1-メチルエチル）、ブトキシ、第3ブトキシ等が含まれる。

【0123】

「アルケニル」との用語には、例えば、エテニル、1-プロペニル、2-プロペニル、1-ブテニル、2-メチル-1-プロペニル等といった、2～6の炭素原子を有する不飽和脂肪族炭化水素鎖が含まれる。2～3の炭素原子を有する炭化水素鎖が好ましい。

【 0 1 2 4 】

「アミド」との用語には、カルボニル基の炭素原子に結合した窒素原子を有する基、ならびに下記の式を有する基が含まれる。

【 化 2 】



式中、R₃およびR₄は、それぞれ独立して水素、アルキル、アルコキシ、またはアルケニルである。

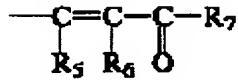
【 0 1 2 5 】

本明細書で使用する「アミノ」との用語には、メチルアミノ、ジエチルアミノ、N₂、N-メチルエチルアミノ等といったアルキルアミノ；N-（エトキシエチル）アミノ、N₂、N-ジ（メトキシエチル）アミノ、N₂、N-（メトキシエチル）（エトキシエチル）アミノ等といったアルコキシアルキルアミノ；および、ビペリジノ、ビペラジノ、モルホリノ等といった含窒素環が含まれる。

【 0 1 2 6 】

「ビニルケトン」との用語には、下記の式を有する基が含まれる。

【 化 3 】

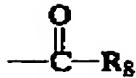


式中、R₅、R₆、およびR₇は、それぞれ独立して水素、アルキル、アルコキシ、またはアルケニルである。

【 0 1 2 7 】

「ケト」との用語には、下記の式を有する基が含まれる。

【 化 4 】



式中、 R_g は、水素、アルキル、アルコキシ、またはアルケニルである。

【 0 1 2 8 】

「含硫黄基」との用語には、メルカブト、アルキルメルカブト（メチルメルカブト、エチルメルカブト等）、アルコキシアルキルメルカブト（メトキシエチルメルカブト等）、アルキルスルホキシド（メチルスルホキシド、プロピルスルホキシド等）、アルコキシアルキルスルホキシド（エトキシエチルスルホキシド等）、アルキルスルホン（メチルスルホン、プロピルスルホン等）、およびアルコキシアルキルスルホン（メトキシエチルスルホン等）が含まれる。含硫黄基はメルカブト基であることが好ましい。

【 0 1 2 9 】

その他の好適な酸化還元媒介剤としては、リガンドを1以上有するオスミウムまたはルテニウム遷移金属錯体であり、各リガンドが含窒素複素環を1以上有し、各含窒素複素環が窒素、酸素、硫黄、およびセレンiumからなる群より選択される第2のヘテロ原子を有するものが挙げられる。

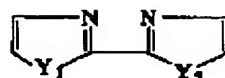
【 0 1 3 0 】

含窒素複素環を1以上有し、かつ各含窒素複素環が第2のヘテロ原子を有するリガンドの例としては、下記の構造を有するリガンドが挙げられる。

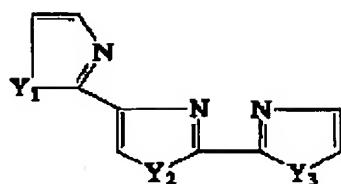
【 化 5 】



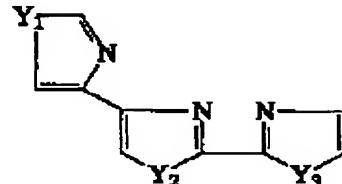
(VI)



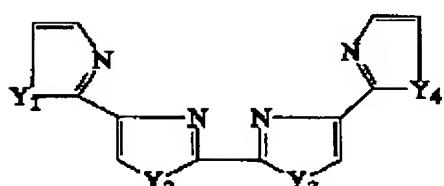
(VII)



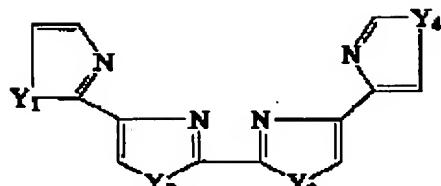
(VIII)



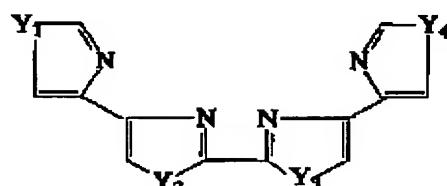
(IX)



(X)



(XI)



(XII)

式中、Y₁、Y₂、Y₃、およびY₄はそれぞれ独立して酸素原子、硫黄原子、セレンウム原子、またはN R₁の式を有する置換窒素原子であり、ここでR₁は、水素、ヒドロキシ、アルキル、アルコキシ、アルケニル、アミド、アミノ、ビニルケトン、ケト、または含硫黄基である。「アルキル」、「アルコキシ」、「アルケニル」、「アミド」、「アミノ」、「ビニルケトン」、「ケト」、および「含硫黄基」との用語は、上述のように定義される。

【0131】

これらリガンドの好適な誘導体としては、例えば、アルキル、アルコキシ、ア

ルケニル、ビニルエステル、およびアミド官能基を、ピリジン環の4の位置（すなわち、窒素に対してパラ）を含む複素環の利用可能な部位に対して、あるいはイミダゾール環の一窒素原子における利用可能な部位に対して付与したものが挙げられる。

【0132】

オスミウム陽イオンとの錯化に好適な2, 2'-ビピリジンの誘導体としては、例えば、4, 4'-ジメチル-2, 2'-ビピリジンのようなモノー、ジー、およびポリアルキル-2, 2'-ビピリジン；4, 4'-ジメトキシ-2, 2'-ビピリジンおよび2, 6'-ジメトキシ-2, 2'-ビピリジンのようなモノー、ジー、およびポリアルコキシ-2, 2'-ビピリジン；4, 4'-ジ（アセタミド）-2, 2'-ビピリジンのようなモノー、ジー、およびポリアセタミド-2, 2'-ビピリジン；4, 4'-ジ（N, N-ジメチルアミノエトキシ）-2, 2'-ビピリジンのようなモノー、ジー、およびポリアルキルアミノアルコキシ-2, 2'-ビピリジン；ならびに、4, 4'-ジメトキシ-6-（N-ピラゾリル）-2, 2'-ビピリジンおよび4, 4'-ジメトキシ-6-（N-ピラゾリルメチル）-2, 2'-ビピリジンのような置換モノー、ジー、およびポリピラゾリル-2, 2'-ビピリジンが挙げられる。

【0133】

オスミウム陽イオンとの錯化に好適な1, 10-フェナントロリンの誘導体としては、例えば、4, 7-ジメチル-1, 10-フェナントロリンのようなモノー、ジー、およびポリアルキル-1, 10-フェナントロリン、ならびに4, 7-ジメトキシ-1, 10-フェナントロリンおよび5-メトキシ-1, 10-フェナントロリンのようなモノー、ジー、およびポリアルコキシ-1, 10-フェナントロリンが挙げられる。

【0134】

好適な2, 2':6', 2''-ターピリジンの誘導体としては、例えば、4, 4', 4'''-トリメチル-2, 2':6', 2''-ターピリジン、4, 4', 4'''-トリエチル-2, 2':6', 2''-ターピリジンのようなモノー、ジー、トリー、およびポリアルキル-2, 2':6', 2''-ターピリジ

ン；4, 4', 4''-トリメトキシ-2, 2': 6', 2''-ターピリジンおよび4'-メトキシ-2, 2': 6', 2''-ターピリジンのようなモノ-、ジ-、トリー、およびポリアルコキシ-2, 2': 6', 2''-ターピリジン；4'-アミノ-2, 2': 6', 2''-ターピリジンのようなモノ-、ジ-、トリー、およびポリアミノ-2, 2': 6', 2''-ターピリジン；4'-ジメチルアミノ-2, 2': 6', 2''-ターピリジンのようなモノ-、ジ-、トリー、およびポリアルキルアミノ-2, 2': 6', 2''-ターピリジン；ならびに、4'-メチルチオ-2, 2': 6', 2''-ターピリジンおよび4-メチルチオ-4'-エチルチオ-2, 2': 6', 2''-ターピリジンのようなモノ-、ジ-、トリー、およびポリアルキルチオ-2, 2': 6', 2''-ターピリジンが挙げられる。

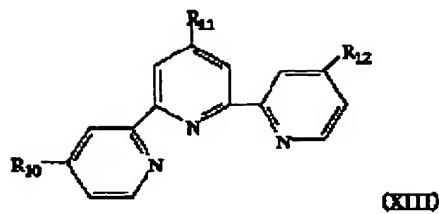
【0135】

好適なビリジンの誘導体としては、例えば、2, 6-ビス(N-ピラゾリル)ビリジン、2, 6-ビス(3-メチル-N-ピラゾリル)ビリジン、2, 6-ビス(2-イミダゾリル)ビリジン、2, 6-ビス(1-メチル-2-イミダゾリル)ビリジン、および2, 6-ビス(1-ビニル-2-イミダゾリル)ビリジンのようなモノ-、ジ-、トリー、およびポリ置換ビリジン；および4-アミノビリジン、4, 4'-ジアミノビリジン、4, 4'-ジ(ジメチルアミノ)ビリジン、および4, 4', 4''-トリアミノターピリジンのようなモノ-、ジ-、トリー、およびポリアミノビリジンが挙げられる。

【0136】

その他の好適なビリジンの誘導体としては、例えば、3つの複素環を含有する化合物が挙げられる。例えば、好適な誘導体の一例は、以下の式によって表される化合物である。

【化6】



式中、 R_{10} 、 R_{11} 、および R_{12} は、それぞれ独立して水素、ヒドロキシ、アルキル、アルコキシ、アルケニル、ビニル、アリル、アミド、アミノ、ビニルケトン、ケト、または含硫黄基である。

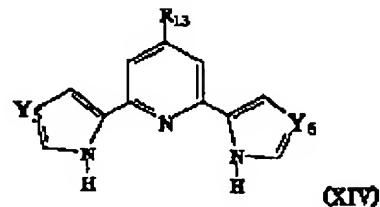
【0137】

「アルキル」、「アルコキシ」、「アルケニル」、「アミド」、「アミノ」、「ビニルケトン」、「ケト」、および「含硫黄基」との用語は、上述のように定義される。

【0138】

その他の好適な酸化還元媒介剤の誘導体としては、以下の式によって表される化合物が挙げられる。

【化7】



式中、 R_{13} は水素、ヒドロキシ、アルキル、アルコキシ、アルケニル、ビニル、アリル、ビニルケトン、ケト、アミド、アミノ、または含硫黄基であり、 Y_5 および Y_6 はそれぞれ独立して窒素または炭素原子である。

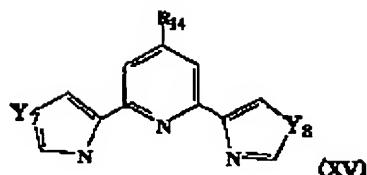
【0139】

「アルキル」、「アルコキシ」、「アルケニル」、「アミド」、「アミノ」、「ビニルケトン」、「ケト」、および「含硫黄基」との用語は、上述のように定義される。

[0140]

さらに他の好適な誘導体としては、以下の式によって表される化合物が挙げられる。

[化8]



式中、 R_{14} は上述のように定義され、 Y_1 および Y_2 は、それぞれ独立して硫黄または酸素原子である。

[0141]

好適な酸化還元媒介剤の例としては、例えば、(a) 2, 2'-ビビリジン、1, 10-フェナントロリン、またはそれらの誘導体のような2つのニ座リガンド(2つのリガンドは必ずしも同種でなくてよい)、(b) 2, 2', 2''-タービリジンおよび2, 6-ジ(イミダゾール-2-イル)-ビリジンのような1つの三座リガンド、または(c) 1つのニ座リガンドおよび1つの三座リガンドと錯化したオスミウム陽イオンが挙げられる。好適なオスミウム遷移金属錯体としては、例えば、 $[(bpy)_3OsLX]^{+3+}$ 、 $[(dimet)_3OsLX]^{+3+}$ 、 $[(dmo)_3OsLX]^{+3+}$ 、 $[ter(OsLX)_3]^{+3+}$ 、 $[trime(tOsLX)_3]^{+3+}$ 、および $[(ter)(bpy)Los]^{+3+}$ が挙げられる。ただし、 bpy は2, 2'-ビビリジン、 $dimet$ は4, 4'-ジメチル2, 2'-ビビリジン、 dmo は4, 4'-ジメトキシ-2, 2'-ビビリジン、 ter は2, 2': 6', 2''-タービリジン、 $trime$ は4, 4', 4''-トリメチル-2, 2': 6', 2''-タービリジン、 L は含窒素複素環式リガンド、および X はフッ素、塩素、または臭素といったハロゲンである。

[0142]

酸化還元媒介剤は、錯体が速やかに酸化および/または還元されるよう、相互間および電極との間で、しばしば電子を速やかに交換する。一般に、鉄錯体はルテニウム錯体よりも酸化しやすく、ルテニウム錯体はオスミウム錯体よりも酸化

しやすい。さらに、酸化還元電位は、通常、配位している複素環式環の数に伴つて増加する。したがって六員複素環式環は、金属に配位している窒素が形式的に陰イオンである場合を除き、五員環よりも電位を増加させる。これは、環における窒素が、隣接する炭素原子の両方に単結合により結合している場合に限られる。窒素が形式的に陽イオンであれば、酸化還元電位は、通常、金属イオンの配位によってさらに増加する。

【0143】

少なくともいくつかの拡散性酸化還元媒介剤は、ビリジンまたはイミダゾール官能基を1以上含有する。イミダゾール官能基は、他の置換機をさらに含有し、例えば、1-ビニルイミダゾールのようなビニルイミダゾール、または1-メチルイミダゾールのようなメチルイミダゾールを形成する。好適な拡散性媒介剤の例として、 $[\text{O}_s(\text{d m o}), (1\text{-ビニルイミダゾール})\text{X}] \text{X}$ 、 $[\text{O}_s(\text{d m o}), (1\text{-ビニルイミダゾール})\text{X}] \text{X}_2$ 、 $[\text{O}_s(\text{d m o}), (\text{イミダゾール})\text{X}] \text{X}$ 、 $[\text{O}_s(\text{d m o}), (\text{イミダゾール})\text{X}] \text{X}_2$ 、 $[\text{O}_s(\text{d m o}), (1\text{-メチルイミダゾール})\text{X}] \text{X}_2$ 、および $[\text{O}_s(\text{d m o}), (\text{メチルイミダゾール})\text{X}] \text{X}_2$ が挙げらる。ただし、上述のように、d m oは4,4'-ジメトキシ-2,2'-ビビリジン、Xはハロゲンである。

【0144】

その他のオスミウム含有酸化還元媒介剤としては、 $[\text{O}_s((\text{メトキシ})_2\text{フェナントロリン}), (\text{N-メチルイミダゾール})\text{X}]^{++}$ 、 $[\text{O}_s((\text{アセトアミド})_2\text{ビビリジン}), (\text{L})\text{X}]^{++}$ で、Lが電位を純化するために選択される一座配位含窒素化合物（イミダゾール誘導体を含むが、これに限定されない）であるもの； $[\text{O}_s(\text{ターピリジン})(\text{L}), \text{C}1]$ で、Lがジアルキルアミノビリジンのようなアミノビリジンであるもの；N-メチルイミダゾールのようなN-置換イミダゾール；オキサゾール；チアゾール；またはメトキシビリジンのようなアルコキシビリジンが挙げられる。上述のように、Xはハロゲンである。

【0145】

オスミウムを含まない拡散性酸化還元媒介剤としては、例えば、7-ジメチルアミノ-1,2-ベンゾフェノキサジン（メルドラブルー（Meldola Blue））、

1, 2-ベンゾフェノキサジン、およびナイルブルー (Nile Blue) のようなフェノキサジン; 3- β -ナフトイル (ブリリアントクレシルブルー (Brilliant Cresyl Blue)) ; テトラメチルフェニレンジアミン (T M P D) ; ジクロロフェノールインドフェノール (D C I P) ; N-メチルフェナゾニウム塩、例えば、フェナジンメトスルファート (P M S) 、N-メチルフェナジンメトスルファート、およびメトキシフェナジンメトスルファート; テトラゾリウム塩、例えば、テトラゾリウムブルーまたはニトロテトラゾリウムブルー; および、フェノチアジン、例えば、トルイジンブルーOが挙げられる。

【 0 1 4 6 】

他の酸化還元種の例としては、安定なキノンと、酸化された状態で、ナイルブルーやインドフェノールのようなキノイド構造を有する種とが挙げられる。好適なキノンの例としては、例えば、ナフトキノン、フェノキノン、ベンゾキノン、ナフテンキノン等の誘導体が挙げられる。ナフトキノン誘導体の例としては、例えば、2, 3-ジクロロ-5, 8-ジヒドロキシ-1, 4-ナフトキノン、2, 3-ジメチル-5, 8-ジヒドロキシ-1, 4-ナフトキノン、2, 3-メトキシ-5-ヒドロキシ-1, 4-ナフトキノン等のようなユグロン (すなわち、5-ヒドロキシ-1, 4-ナフトキノン) およびその誘導体が挙げられる。その他の例としては、例えば、2-クロロ-3-モルホリノ-1, 4-ナフトキノンといったモルホリノ-ナフトキノンのようなアミノナフトキノン; 2-メチル-3-ビペリジノ (peperidino) -1, 4-ナフトキノンのようなペペリジノ-ナフトキノン; 2-エトキシ-3-ビペラジノ-1, 4-ナフトキノンのようなビペラジノ-ナフトキノン; その他が挙げられる。

【 0 1 4 7 】

好適なフェノキノン誘導体の例としては、例えば、3, 3', 5, 5'-テトラメチルジフェノキノン、3, 3', 5, 5'-テトラヒドロキシジフェノキノン等のようなセルリグノン (すなわち、3, 3', 5, 5'-テトラメトキシジフェノキノン) およびその誘導体が挙げられる。

【 0 1 4 8 】

好適なベンゾキノン誘導体の例としては、例えば、2,3,5-トリメチル-1,4-ベンゾキノン、2,3-ジメチル-5-メトキシ-1,4-ベンゾキノン、2,3-ジメチル-5-ヒドロキシ-1,4-ベンゾキノン等のような補酵素Q₁（すなわち、2,3-ジメトキシ-5-メチル-1,4-ベンゾキノン）およびその誘導体が挙げられる。

【0149】

その他の好適なキノン誘導体としては、例えば、補酵素Q₁、Q₂、Q₃、Q₄、およびQ₁₀を含む補酵素Qのようなアセナフテンキノンおよびユビキノンが挙げられる。

【0150】

オスミウムを含まない拡散性酸化還元媒介剤のさらに他の好適な例としては、例えば、テイラーズブルー (Taylor's blue) (すなわち、1,9-ジメチルメチレンブルー)、N,N'-ジエチルチアシアニンヨウ化物、およびチオニンが挙げられる。

【0151】

他の方法において、感知層32は非浸出性（すなわち、非放出性）の酸化還元媒介剤を含有し、作用電極22の一部分に配置されている。非浸出性の酸化還元媒介剤としては、例えば、酸化還元ポリマー（すなわち、酸化還元種を1以上有するポリマー）を用いることができる。上記非浸出性酸化還元媒介剤は、一般に約5分未満である測定期間中、作用電極22より試料中に、ほとんど、または全く浸出しないことが好ましい。媒介剤の試料中への浸出を防ぐため、本実施形態の酸化還元媒介剤は、作用電極22に結合させるか、または固定化することができる。酸化還元媒介剤は、公知の方法、例えば、逆荷電された（countercharged）ポリマー電解質の間に複数のイオン架橋を形成すること、作用電極上のポリマーに酸化還元媒介剤を共有結合（covalent attachment）させること、酸化還元媒介剤に対して高い親和性を有する基質に酸化還元媒介剤を取り込むこと、または、作用電極に結合している化合物に酸化還元媒介剤を生体共役（bioconjugation）させること等によって、作用電極に結合させるか、または他の方法により固定化することができる。一実施形態においては、陰イオン性酸化還元化合物を取

り込むため、陽イオン交換膜 (cationic exchange membrane) を用いることができる。同様に、別の実施形態においては、陽イオン性酸化還元化合物を取り込むために、陰イオン交換膜 (cationic exchange membrane) を用いることができる。生体接合に関連するさらに別の実施形態においては、ビオチン結合酸化還元媒介剤を、作用電極に近接または固定化した基質中のアビジンまたはストラプトアビジン (straptavidin) に共役させることができる。さらに別の実施形態においては、ジゴキシンまたはジゴキシゲニン酸化還元媒介剤を、作用電極に近接または固定化した基質中のアンチジゴキシン (antidigoxin) と反応させる。

【0152】

好ましい非浸出性酸化還元媒介剤は、ポリマー遷移金属化合物または錯体といった酸化還元ポリマーである。一般に、酸化還元ポリマーの形成に使用されるポリマーは、リガンドとして酸化還元種と結合するピリジン、イミダゾール、またはこれらの誘導体のような含窒素複素環を有している。上述した遷移金属錯体のような酸化還元種との錯化に好適なポリマーには、例えば、ピリジンやイミダゾールといったペンドント含窒素複素環 (pendant nitrogen-containing heterocycles) を付与して修飾したポリ (アクリル酸) またはポリアクリルアミドのポリマーおよびコポリマーはもちろん、ポリ (1-ビニルイミダゾール) (「PVI」と称す) およびポリ (4-ビニルピリジン) (「PVP」と称す) のようなポリマーおよびコポリマーも含まれる。ポリ (アクリル酸) の修飾は、カルボン酸官能基の少なくとも一部を、4-エチルアミノピリジンのようなアミノアルキルピリジンまたはアミノアルキルイミダゾールと反応させ、アミドを形成することにより行ってもよい。PVI、PVP、およびポリ (アクリル酸) の好適なコポリマー置換基としては、アクリロニトリル、アクリルアミド、アクリルヒドラジド、および置換または四級化1-ビニルイミダゾールが挙げられる。上記コポリマーは、ランダムコポリマーまたはブロックコポリマーであってよい。

【0153】

非浸出性酸化還元媒介剤の遷移金属錯体は、一般に、ポリマーの含窒素複素環 (例えば、イミダゾールおよび/またはピリジン環) に共有または配位結合する。遷移金属錯体は、ビニル官能基を有していてもよく、このビニル官能基を介し

て錯体が共重合される。好適なビニル官能基としては、例えば、ビニル複素環、アミド、ニトリル、カルボン酸、スルホン酸、またはその他の極性ビニル化合物が挙げられる。このタイプの酸化還元ポリマーの一例は、ポリ(ビニルフェロセン)、または水中での酸化還元ポリマーの膨張を増大させるために官能化されたポリ(ビニルフェロセン)の誘導体が挙げられる。

【0154】

別のタイプの酸化還元ポリマーは、複数のイオンブリッジ (ion-bridges) を形成することによりイオン結合した酸化還元種を含有している。一般に、このタイプの媒介剤は、逆荷電酸化還元種に結合した荷電ポリマーを含んでいる。このタイプの酸化還元ポリマーの例としては、オスミウムまたはルテニウムポリピリジル陽イオンのような複数の正荷電酸化還元種に結合したナフィオン (Nafion: 登録商標) (DuPont) といった負荷電ポリマーが挙げられる。イオン結合した媒介剤の他の例は、フェリシアン化物またはフェロシアン化物のような負荷電酸化還元種に結合した、四級化ポリ(4-ビニルビリジン)またはポリ(1-ビニルイミダゾール)のような正荷電ポリマーである。好ましいイオン結合酸化還元種は、逆荷電ポリマー内に結合した、高荷電 (multiply charged) で、しばしばポリ陰イオン性の酸化還元種である。

【0155】

他の好適な酸化還元ポリマーとしては、ポリマーに配位結合した酸化還元種が挙げられる。例えば、媒介剤は、ポリ(1-ビニルイミダゾール)またはポリ(4-ビニルビリジン)に対するオスミウム、ルテニウム、またはコバルト2, 2'-ビビリジル錯体の配位により、あるいは、例えば、1-ビニルイミダゾールまたは4-ビニルビリジンと4-ビニル-2, 2'-ビビリジルオスミウム、ルテニウム、またはコバルト錯体との共重合により形成される。

【0156】

一般に、オスミウムまたはルテニウム遷移金属錯体と非浸出性酸化還元ポリマーのイミダゾールおよび/またはビリジン基との比率は、1:20~1:1、好ましくは1:15~1:2の範囲、より好ましくは1:10~1:4の範囲である。一般に、酸化還元電位は、少なくとも部分的に、ポリマーの種類に左右され

るが、酸化還元電位の大きさは、ポリ(アクリル酸) < P V I < P V P である。

【 0 1 5 7 】

電極表面に酸化還元ポリマーを固定化するために、様々な方法が使用できる。一方法は、吸着による固定化である。この方法は、比較的高分子量を有する酸化還元ポリマーに特に有用である。ポリマーの分子量は、例えば、架橋によって増加させることができる。酸化還元ポリマーのポリマーは、例えば、ヒドラジド、アミン、アルコール、複素環式窒素、ビニル、アリル、およびカルボン酸基のような、架橋剤を用いて架橋できる官能基を含有していてもよい。これらの官能基は、ポリマーまたは1以上のコポリマーに設けてよい。この代わりとして、またはこれに加えて、例えば、四級化のような反応により、官能基を付与してもよい。一例は、プロモエチルアミン基によるP V Pの四級化である。

【 0 1 5 8 】

好適な架橋剤としては、例えば、エポキシを2以上有する分子(例えば、ポリ(エチレングリコール)ジグリシジルエーテル(P E G D G E)、アルデヒド、アジリジン、アルキルハライド、およびアジド官能基またはこれらを組み合わせたものが挙げられる。ポリマーが複数のアクリレート官能基を有する場合、ポリマーは、ジーまたはポリチオールによって架橋することができる。ポリマーが複数のチオール官能基を有している場合、ポリマーは、ジーまたはポリアクリレートによって架橋することができる。その他の架橋剤の例としては、アミンまたは他の窒素化合物で縮合するため、カルボン酸または他の酸の官能基を活性化する化合物が挙げられる。これらの架橋剤としては、カルボジイミド、あるいは活性なN-ヒドロキシスクシンイミドまたはイミダート官能基を有する化合物が挙げられる。さらに他の架橋剤の例として、キノン(例えば、テトラクロロベンゾキノンおよびテトラシアノキノジメタン)および塩化シアヌールが挙げられる。その他の架橋剤を使用することもできる。いくつかの実施形態においては、架橋剤を付与する必要ない。架橋および架橋剤に関するさらなる説明や例示が、米国特許第5,262,035号;第5,262,305号;第5,320,725号;第5,264,104号;第5,264,105号;第5,356,786号;および第5,593,852号に記載されており、それらは引照をもって本明細書に組み込ま

れている。

【 0 1 5 9 】

別の実施形態においては、酸化還元ポリマーは、電極表面が官能化し、次に上記電極表面における官能基に酸化還元ポリマーを、しばしば共有結合により、化学結合させることによって固定化される。このタイプの固定化の一例は、ポリ(4-ビニルピリジン)によって開始される。ポリマーのピリジン環は、[O s (b p y) : C 1] ⁺⁺ (ただし、b p y は 2, 2' - ビピリジン) のような可還元／可酸化種と部分的に錯化する。ピリジン環の一部は、2-プロモエチルアミンとの反応により四級化される。そしてポリマーは、例えば、ポリ(エチレンリコール)ジグリシジルエーテルのようなジエポキシドを用いて架橋される。

【 0 1 6 0 】

炭素表面は、酸化還元種またはポリマーを付着させるため、例えば、ジアゾニウム塩の電気還元によって修飾することができる。一説明としては、p-アミノ安息香酸のジアゾ化により形成されたジアゾニウム塩の還元により、フェニルカルボン酸官能基を有する炭素表面が修飾されることが挙げられる。これらの官能基は、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(EDC)のようなカルボジイミドにより活性化できる。活性化された官能基は、上述のオスミウム含有酸化還元ポリマー、または2-アミノエチルフェロセンのようなアミン官能化酸化還元対(amine-functionalized redox couple)と結合し、酸化還元対を形成する。

【 0 1 6 1 】

同様に、金およびその他の金属の表面も、シスタミンのようなアミンまたはチオクト酸のようなカルボン酸により官能化できる。例えば [O s (b p y) : (ピリジン-4-カルボキシレート) C 1] ⁺⁺ のような酸化還元対は、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(EDC)により活性化され、金結合アミンと反応してアミドを形成する応答性O-アシルイソ尿素を形成する。チオクト酸のカルボン酸官能基は、EDCにより活性化され、ポリマーまたはタンパク質アミンと結合してアミドを形成する。

【 0 1 6 2 】

使用される酵素が P Q Q グルコースデヒドロゲナーゼまたはグルコースオキシターゼである場合、好ましい非浸出性酸化還元媒介剤は、標準カロメル電極 (SCE) に対し、約 -300 mV ~ 約 +400 mV の酸化還元電位を有する。最も好ましい不浸出酸化性還元媒介剤は、オスミウム酸化還元中心を有し、SCE に対して +100 mV よりも負の酸化還元電位、好ましくは SCE に対して 0 mV よりも負の酸化還元電位、最も好ましくは SCE に対して -150 mV 程度の酸化還元電位を有する。

[0 1 6 3]

少なくともいくつかの例においては、センサーの酸化還元媒介剤は空気酸化可能である。これは、酸化還元媒介剤が空気により酸化され、好ましくは、媒介剤の少なくとも 90 % が、センサーへの試料の導入前に酸化状態となっていることを意味する。空気酸化可能な酸化還元媒介剤としては、2つのモノー、ジー、またはポリアルコキシ-2, 2' - ビピリジンあるいはモノー、ジー、またはポリアルコキシ-1, 10 - フェナントロリンリガンドを有するオスミウム陽イオン錯体が挙げられるが、ここで上記2つのリガンドは同種である必要はなく、ピリジンおよびイミダゾール官能基を有するポリマーまたは他のリガンドとさらに錯化している。特に、ポリ(4-ビニルピリジン)またはポリ(1-ビニルイミダゾール)と錯化した Os [4, 4' -ジメトキシ-2, 2' - ビピリジン] : C 1⁺⁺ は、空気中で約 90 % 以上酸化する。酸化還元媒介剤の空気酸化は、酸化還元媒介剤が固体である時、例えば、乾燥した状態でセンサーを被覆し、保管されている時等に起こる。あるいは、酸化還元媒介剤の空気酸化は、酸化還元媒介剤が溶液中に存在する時、例えば、溶液をセンサーに塗布して乾燥する前に起こる。酸化還元媒介剤が溶液中で空気酸化される場合、酸化還元媒介剤を含有する溶液を、製造工程での溶液の使用前に十分な期間保管し、媒介剤を空気酸化させてもよい。

[0 1 6 4]

[第2の電子伝達剤]

本発明の好ましい実施形態においては、センサーは、酸化還元媒介剤と、酸化還元媒介剤および分析物への、または酸化還元媒介剤および分析物からの電子移

動を可能にする第2の電子移動剤とを備えている。第2の電子移動剤は、拡散性または非浸出性（例えば、酸化還元媒介剤に取り込まれるか、あるいは酸化還元媒介剤に配位結合、イオン結合、または共有結合している）であってよい。好適な第2の電子移動剤の一例は、分析物の反応を触媒する酵素である。例えば、分析物がグルコースである場合、グルコースオキシダーゼ、またはビロロキノリンキノングルコースデヒドロゲナーゼ（PQQ）のようなグルコースデヒドロゲナーゼを使用する。分析物がラクテートである場合、ラクテートオキシダーゼがこの役割を果たす。その他の分析物に対しては、他の酵素を使用できる。これらの酵素は、分析物と電極との間において酸化還元媒介剤を介して電子を移動させることにより、分析物の電気分解を触媒する。いくつかの実施形態においては、試料中への不要な浸出を防止するため、第2の電子伝達剤は非浸出性であり、より好ましくは作用電極に固定化されている。これは、例えば、非浸出性の第2の電子移動剤を非浸出性酸化還元媒介剤と架橋させ、作用電極上に非浸出性成分で形成された検知層を設けることにより達成される。他の実施形態においては、第2の電子移動剤は拡散性である（さらに、試料室のいずれかの面に配置するか、または試料中に配してもよい）。

【 0 1 6 5 】

(対電極)

図1～4に示される対電極24は、作用電極22と同様に構成することができる。対電極24は、対／参照電極であってもよい。あるいは、別の参照電極を、試料室と接触するように設けてもよい。対／参照電極または参照電極に用いる好適な材料としては、非導電性基材上に印刷されたAg/AgClまたはAg/AgBr、あるいは銀金属基体上の塩化銀が挙げられる。対電極の作製には、作用電極22の構成に使用されるのと同様の材料および方法を用いてもよいが、異なる材料や方法を用いることもできる。また、電量計、ポテンシオスタット、またはその他の測定装置といった外部電子機器（図示せず）への簡便な接続のため、電極にタブ25を設けてもよい。

【 0 1 6 6 】

(電極形態)

本発明の一実施形態においては、作用電極22および対電極24は、図1および図3に示すように、互いに向かい合せに配置され対向し、対向電極対を形成している。この好ましい形態においては、試料室26は、一般に、これら2つの電極間に配置される。この対向する電極形態においては、電極同士が約0.2m以下での距離で離間し（すなわち、作用電極の少なくとも一部分が、対電極の一部分から200μm以下の距離で離間）、好ましくは100μm以下、最も好ましくは50μm以下の距離で離間していることが好ましい。

【 0 1 6 7 】

電極は、互いに真向かいに向かい合う必要はなく、わずかにずれてもよい。さらに、2つの電極は同じサイズである必要はない。対電極24が、少なくとも作用電極22の作用面と同等の大きさを有することが好ましい。また、対電極22を、櫛状の歯（tines）で形成することもできる。対電極および作用電極の両方に関するその他の配置も、本発明の範囲に含まれる。しかしながら、この特定の実施形態においては、作用電極の少なくとも一部分と対電極の一部分との離間距離は、上述の特定範囲を超えないことが好ましい。

【 0 1 6 8 】

図11A、11B、および11Cは、上述のような対向する電極22、24の対の別の実施形態を説明するものである。2つの電極22、24の間の重複領域21は、一般に、試料の分析が行なわれる測定域に相当する。各電極22、24は導電面であり、コンデンサの平板として働く。電極22、24の間の測定域は、平板間で誘電体層として働く。よって、2つの電極22、24の間には静電容量が存在する。この静電容量は、重複する電極22、24の大きさ、電極22、24の離間距離、および電極22、24間に存在する物質の誘電率の関数である。したがって、電極22、24の重複領域21のサイズと、電極22、24間に存在する物質（例えば、空気または吸収材）の誘電率とが既知であれば、電極間の離間距離を算出して、測定域の体積を求めることができる。

【 0 1 6 9 】

図11Aは、電極22、24を対向配置で設置した、本発明の一実施形態を説明するものである。この特定のセンサー形態を有する分析物センサーにおいて、

同様に構成されたセンサー間の静電容量を一定にするため、位置合わせ（すなわち、2つの電極相互の相対的な位置決め）を一定にすべきである。各電極の位置が、図11Aに示す位置からx-y平面において移動すると、重複領域の大きさが変化し、ゆえに静電容量が変化する。同様のことが、測定域の容積についても言える。

【0170】

図11Bおよび11Cは、電極22、24を対向配置で設置した、本発明の別の実施形態を説明するものである。これらの特定の配置においては、静電容量または測定域の容積を変化させることなく、各電極の位置を、x-y平面において、他方の電極に対して少なくとも極めて僅かな距離だけ移動させることができる。これらの電極配置においては、各電極22、24は、それぞれ、他方の電極の対応するアームと重なり合うアーム122、124を備えている。2つのアーム122、124は（図11Aに示すように）互いに平行するものではなく、アーム122、124は、互いにゼロよりも大きい角度123を成すように配置されている。さらに、アーム122、124は、重複領域21の範囲を超えて伸びている（すなわち、各アームは、アーム長222、224と、重複領域21の幅121との差に相当する余剰長を、それぞれ有している）。これらの電極配置によれば、電極22、24の位置合せにおける不正確さに一定の許容量があり、その許容量においては電極配置の静電容量は変化しない。位置合せにおける不正確さの所望許容量は、アーム122、124が重複する角度123、および、重複領域21の幅121に対する各アーム122、124の余剰長の長さを変化させることによって、電極配置によって設定することができる。一般に、アーム122、124が垂直（すなわち、角度123が90°）に近づくほど、許容される不正確さは大きくなる。また、重複領域21の幅121に対する各アーム122、124の余剰長（両アームの余剰長は、同等であっても、相違してもよい）が大きくなるほど、許容される不正確さは大きくなる。反対に、不正確さの許容量が大きくなるほど、（所与の電極の幅、厚さ、および、他方の電極と交差する角度123に関し）電極のサイズは大きくなる。このように、一方の電極が他方の電極に対して移動し得る最小距離は、電極に要する材料の量と釣り合っている。一

般に、交差角度 123 は、5~90 度、好ましくは 30~90 度、さらに好ましくは 60~90 度の範囲である。一般に、アーム 122、124 の余剰長（アーム長 222、224 と重複領域 21 の幅 121 との差に相当）と重複領域 21 の幅 121 との比率は、0.1:1~50:1、好ましくは 1:1~15:1、より好ましくは 4:1~10:1 の範囲である。

【 0 1 7 1 】

本発明の別の実施形態においては、図 2 に示すように、2 つの電極 22、24 が同一平面上に存在する。この場合、試料室 26 は、両電極と接触しており、電極側とは反対の側が非導電性の不活性基体 30 と結合している。不活性基体に好適な材料は、ポリエステルのような非導電性物質である。

【 0 1 7 2 】

本発明のセンサーの他の形態もまた可能である。例えば、2 つの電極が、互いに角度を成す複数の面に形成されしてもよい。このような形態の一つに、直角を成す複数の面に電極を備えたものが挙げられる。別の可能な形態は、管の内壁のような湾曲した面に電極を備えている。作用電極および対電極は、管の相対する側に、互いに対向するように配置されている。これは、対向電極対の別の一例である。あるいは、電極を、管の壁面に互いに近接させて（例えば、一方が他方の上部に位置するように、または、並べて）配置してもよい。

【 0 1 7 3 】

いずれの形態においても、2 つの電極は、電気化学センサーの短絡を防ぐため、直接電気的に接觸しないように配置しなければならない。対向する電極の間隔が平均して約 100 μm 以下である場合、短絡を回避することは困難となる。

【 0 1 7 4 】

図 1 および 3 に示すように電極が互いに対向している場合、電極を離間させておくために、スペーサー 28 を使用することができる。スペーサーは、一般に、感圧性粘着性物質、ポリエステル、マイラー（Mylar：商標）、ケブラー（Kevlar：商標）、または他の強靭で薄いポリマーフィルム、あるいは、化学的に不活性であることから選択されるテフロン（Teflon：商標）フィルムのような薄いポリマーフィルムといった、不活性の非導電性物質で構成される。スペーサー 28

は、電極間の接触防止に加え、図1～4に示すように、しばしば試料室26の境界の一部としても機能する。他のスペーサーとしては、粘着性物質の層および両面粘着テープ（例えば、相対する面に粘着性物質を備えたキャリヤフィルム（carrier film））の層が挙げられる。

【 0 1 7 5 】

（試料室）

試料室26は、図1～4に示すように、一般に、電極22、24、不活性基体30、およびスペーサー28の組み合わせによって定められる。測定域は、試料室内に含まれ、分析物アッセイで分析される試料の部分のみを収容する試料室の領域である。図1および2に示す本発明の実施形態においては、試料室26は、2つの電極22、24および／または不活性基体30の間の空間である。この実施形態では、試料室は、好ましくは約1μL以下、より好ましくは約0.5μL以下、最も好ましくは約0.25μL以下の体積を有する。図1および2に示した本発明の実施形態においては、測定域は、試料室の体積とほぼ同等の体積を有する。好ましい実施形態では、測定域が試料室の80%を、より好ましい実施形態では90%を、最も好ましい実施形態では100%を占める。

【 0 1 7 6 】

図3に示す本発明の別の実施形態において、試料室26は、電極22、24に近接する領域よりもはるかに広い空間を有する。この構成によれば、図5に示すように、1以上の試料室と接触する複数の電極を設けることが可能となる。この実施形態においては、試料室26は、好ましくは約1μL以下、より好ましくは約0.5μL以下、最も好ましくは約0.25μL以下の体積を収容する大きさに設定される。測定域（すなわち、分析を行う試料の体積を収容する領域）は、通常、約1μL以下、好ましくは約0.5μL以下、より好ましくは約0.25μL以下、最も好ましくは0.1μL以下の試料の体積を収容する大きさに設定される。この実施形態における特に有用な一形態は、図3に示すように、作用電極22および対電極24を互いに対向するように配置したものである。この実施形態においては、分析を行う試料の部分を収容する領域に相当する測定域は、作用電極の作用面で境界づけられ、対向する2つの電極間に位置している試料室2

6 の部分である。

【 0 1 7 7 】

上述の両実施形態において、試料室および測定域の厚みは、一般に、スペーサー 28 の厚み（例えば、図 1 および 3 においては電極間の距離、図 2 においては電極と不活性基体との間の距離）に相当する。スペーサーは、例えば、粘着性物質または両面の粘着テープもしくはフィルムであってよい。分析物の速やかな電気分解を促進するため、与えられた試料体積に対し、より多くの試料が電極表面に接触するよう、この厚みは小さいことが好ましい。さらに、薄い試料室においては、測定時間に対して拡散時間が長くなるため、分析物アッセイ中に分析物が試料室の他の部分から測定域へと拡散することに起因する誤差が低減される。一般に、試料室の厚みは、約 0.2 mm 以下である。好ましくは、試料室の厚みは約 0.1 mm 以下であり、さらに好ましくは、試料室の厚みは約 0.05 mm 以下である。

【 0 1 7 8 】

試料室は、他の方法を用いて形成してもよい。典型的な方法として、エンボシング、インデンティング、または、作用電極 22 または対電極 24 のいずれかが形成された基板に凹部を形成するその他の方法が挙げられる。図 12A および 12B は、このような構造の一実施形態を示したものである。まず、不活性の非導電性基材 102 上に導電層 100 を形成する。先に述べたように、導電層 100 としては、金、炭素、白金、二酸化ルテニウム、パラジウム、またはその他の不腐食性材料が挙げられる。不活性の非導電性基材 102 は、ポリエステル、その他のポリマー、またはその他の非導電性の変形可能な材料を用いて作製することができる。次に、導電層 100 の少なくとも一部が凹部 104 内に含まれるように、非導電性基材 102 の領域に凹部 104 を形成する。凹部 104 は、インデンティング、変形（deforming）、または、その他の基材 102 の押込みを含む、様々な方法を用いて形成することができる。典型的な凹部の形成方法の補足的な一例としては、基材 102 のエンボシングが挙げられる。例えば、基材 102 を、パンチ部材または溝のような、隆起部分を有するエンボシングロールまたはスタンプと接触させ、凹部 104 を形成してもよい。いくつかの実施形態において

ては、材料を軟化させるため、基体102を加熱してもよい。

【 0 1 7 9 】

凹部104は、円形、楕円形、矩形、またはその他のあらゆる規則形もしくは不規則形とすることができます。あるいは、凹部104を、基体102の一部に沿って伸びる溝として形成することができます。導電層100は、溝全体または溝の一部に沿って伸びるように設けることができる。測定域は、例えば、感知層32を溝の特定の領域内に存在する導電層100の部分上にのみ配置することによって、溝内の特定の領域に限定することができます。あるいは、第2の電極107を、第1の電極105の所望の領域の上方にのみ配置することによって、測定域を限定してもよい。

【 0 1 8 0 】

導電層100の少なくとも一部、場合によっては全部が、凹部104内に位置している。導電層100のこの部分は、第1の電極105（対電極、または作用電極）としての機能を果たす。導電層100が作用電極を形成する場合、図12Bに示すように、非浸出性の酸化還元媒介剤および／または第2の電子移動剤を凹部104内に配置することによって、感知層32を導電層100の一部の上方に形成することができる。拡散性の酸化還元媒介剤または第2の電子移動剤を使用する場合、上記拡散性物質を試料室のいずれかの面または試料中に配置することができる。

【 0 1 8 1 】

次に、第2の基材106上に第2の導電層を配置することによって、第2の電極107を形成する。そして、第2の電極107を、第1の電極105の上方に、対向するように設置する。図示していないが、酸化還元媒介剤が非浸出性の場合、第1の電極105が対電極として機能するならば、よって作用電極として機能する第2の電極107上に感知層32を配置することは理解されるであろう。しかしながら、酸化還元媒介剤が拡散性の場合は、酸化還元媒介剤は試料室のいずれかの面に配置するか、または試料中に配することができる。

【 0 1 8 2 】

一実施形態においては、第2の電極107が凹部内に達するよう、第2の基体

106を第1の基材102および／または導電層100の押し下げられていない部分に載せる。別の実施形態においては、第1および第2の基材102、106の間にスペーサー（図示せず）が存在する。この実施形態では、第2の電極107は凹部内に存在しても、存在していなくてもよい。いずれの場合においても、第1および第2の電極105、107は接触しない。さもなければ、2つの電極が短絡する。

【 0 1 8 3 】

凹部104の深さと、導電層100、感知層32、および第2の電極107の凹部104内に存在する部分があればその部分の体積とによって、測定域の体積が決定する。よって、測定域の体積の予測可能性は、凹部104の構成がどの程度一定しているかに依存する。

【 0 1 8 4 】

導電層100に加え、図14Aに示すように、後に詳しく説明する吸収層103を、凹部104を形成する前に基材102上に配置するしてもよい。図14Bに示すように、吸収材103に対し、導電層100および基材102と共に、インデンティング、エンボシング、またはその他の変形を施してもよい。あるいは、導電層100および基材102にインデンティング、エンボシング、またはその他の変形加工が施され凹部104が形成された後に、配置してもよい。

【 0 1 8 5 】

分析物センサーを形成する他の典型的な方法においては、図13Aおよび13Bに示すように、凹部114を第1の基材112に形成する。凹部は、インデンティング、エンボシング、エッチング（例えば、フォトリソグラフィー法または基材の一部のレーザー除去）、あるいは、その他の基材112の一部の変形または除去によって形成することができる。次に、第1の導電層110を、凹部114内に形成する。上述したあらゆる導電性材料を用いることができる。好みの材料は、例えばエルコンインク（Ercun, Inc.）（Wareham, MA）より入手可能な導電性カーボンインクといった導電性インクである。導電性インクは、一般に、溶媒または分散剤に溶解または分散した金属または炭素を含有している。溶媒または分散剤が除去されると、金属または炭素が、第1の電極115として用いられ

る導電層110を形成する。上述のように、第2の電極117を第2の基材116に形成し、凹部114の上方に配置する。非浸出性の酸化還元媒介剤を使用する実施形態においては、図13Bに示すように、第1の電極115上に感知層32を形成し、作用電極を形成する。非浸出性の酸化還元媒介剤を使用する他の実施形態においては、第2の電極117上に感知層32を形成して作用電極を形成してもよい。あるいは、拡散性の酸化還元媒介剤が用いる場合、作用電極は電極上に配置された感知層32を備えている必要はない。実際のところ、酸化還元媒介剤は試薬中に配してもよく、また含まれていれば電子移動剤も同様であるため、感知層を設ける必要はない。あらゆる拡散性の成分は、個別に試料室のいずれかの面に配するか、または試料中に配置することができる。さらに、吸収材(図示せず)を凹部内、例えば第1の電極115上に形成してもよい。

【0186】

導電性インクには、ポリウレタン樹脂、セルロース誘導体、エラストマー(例えば、シリコーン、ジエン重合体、またはアクリロニトリル-ブタジエン-ステレン(A B S)樹脂)、高フッ素化ポリマーのようなバインダーが含まれていてもよい。バインダーの硬化は導電層110の導電率を増大させるが、硬化を行うことは必須ではない。バインダーの硬化方法は、使用する特定のバインダーの性質次第で決定される。いくつかのバインダーは、熱および/または紫外線によって硬化する。

【0187】

これらの構造によれば、測定域の体積が、凹部104の正確性および再現性に少なくとも部分的に左右される電気化学センサーが形成される。200 μ m以下の寸法であっても再現可能な凹部104を形成するためエンボシング、レーザー・エッチング、フォトリソグラフィーエッチング、およびその他の方法を用いることができる。

【0188】

(吸収材)

試料室は、室内に試料が配置される前は空であってもよい。あるいは、試料室は、測定過程において液体試料を吸収して保持する吸収材34を備えていてもよ

い。好適な吸収材としては、ポリエステル、ナイロン、セルロース、およびニトロセルロースのようなセルロース誘導体が挙げられる。吸収材は、試料室の毛管作用を補うか、あるいは、好ましくはそれに取って代わる吸上げ作用 (wicking action) によって、小体積試料の吸上げを促進する。これに加えて、またはこの代わりとして、試料室の壁の一部または全体を、例えばゾニルFSO (Zonyl FS 0) のような界面活性剤で覆ってもよい。

【 0 1 8 9 】

いくつかの実施形態においては、吸収材は、吸収材が溶解または分散した液体またはスラリーを用いて配置される。その後、液体またはスラリーにおける溶媒または分散媒を、加熱または蒸発処理によって除去してもよい。好適な吸収材としては、例えば、水等の適当な溶媒または分散媒に溶解または分散した、セルロースまたはナイロン粉末が挙げられる。特定の溶媒または分散媒は、作用電極 2 の材料に適合すべきである (例えば、溶媒または分散媒は電極を溶解すべきではない)。

【 0 1 9 0 】

吸収材の最も重要な機能の一つは、試料室を満たすのに必要な、センサーの測定域に相当する液体の体積を減少させることである。測定域内の試料の実際の体積は、吸収材内の空孔量により部分的に決定される。通常、好適な吸収材は、約 5 % から約 50 % の空孔を有する。好ましくは、吸収材は、約 10 % から 25 % の空孔を有する。

【 0 1 9 1 】

液体を吸収材に置き換えることは有益である。吸収材を付与することにより、試料室 26 を満たすのに必要な試料が少なくてすむ。これにより、測定値を得るために必要な試料体積が減少し、さらに試料の電気分解に要する時間までもが低減される。

【 0 1 9 2 】

吸収材 34 は、試料がタブ 33 に接触し、タブに吸収され、吸収材 34 の吸上げ作用によって試料室 26 に運ばれるように、センサーまたはセンサーの開口部から伸びる、吸収材と同じ材質で構成されたタブ 33 を備えていてもよい。これ

により、試料を試料室 26 に導くための好ましい方法が提供される。例えば、血液を取り出すためにランセットを突き刺した動物（ヒトを含む）の領域に、センサーを接触させる。血液はタブ 33 に接触し、吸収材 34 の吸上げ作用によって試料室 26 に吸い上げられる。試料をセンサーへ直接移動させることは、試料が非常に少量である場合、例えば、近表面毛細血管がそれほど多く存在せず、1 μL 未満の血液試料体積しか供給されない動物の部分をランセットで穿孔する場合に、特に重要となる。

【 0 1 9 3 】

吸収材の吸上げ作用以外の方法を用い試料室または測定域へ試料を輸送することができる。このような輸送手段の例としては、吸収材の吸上げ作用のみならず、試料を試料室に押し込むための試料への圧力印加、試料を試料室内に引き込むためのポンプまたは他の真空形成方法による試料室内における真空形成、薄い試料室の壁面との試料の界面張力に起因する毛管作用が挙げられる。

【 0 1 9 4 】

試料流の流れにと関連させてセンサーを使用することもできる。この形態においては、試料流が試料室を通って流れるようにする。この流れを定期的に停止させ、クロロメトリーのような電気化学的方法によって分析物濃度を測定する。測定後流れを再開させ、これによりセンサーから試料を取り除く。あるいは、非常に遅い速度で試料が試料室を通過するようにし、分析物が全て通過中に電気分解され、分析物濃度と流速のみに依存する電流が流れるようにしてもよい。

【 0 1 9 5 】

その他の充填材を用いて測定域を充填し、試料体積を減少させてもよい。例えば、ガラスビーズを測定域内に配置し、空間を占有させることができる。体液が測定域に容易に流れ込むよう、充填剤は親水性であることが好ましい。表面積が大きいガラスビーズ等の場合、充填材は、その大きな表面積と親水性とによって、体液を測定域に吸上げることもできる。

【 0 1 9 6 】

全てのセンサー組立部品は、試料が確実に電極に接触し続け、かつ試料室および測定域が同体積を維持するように、しっかりと接合される。これは、決まった

試料体積における測定値が必要とされる、クロメトリーによる試料の分析においては重要な考慮事項である。センサーの接合方法の一例を、図1および2に示す。2つの平板38は、センサーの相対する端部にそれぞれ設置される。これらの平板は、一般に、プラスチックのような非導電性材料で構成される。平板は、2つの平板間にセンサーを挟んで接合するように設計されている。好適な接合部材としては、接着剤、クランプ、ナット、およびボルト、ネジ等が挙げられる。

【 0 1 9 7 】

(その他のセンサー デザイン)

図18A～18Cは、薄膜センサーを形成するための、その他のセンサー デザインを説明するものである。センサーは、第1基板500を備え、この第1基板500上に作用電極502が形成されている。作用電極502は、外部電子機器との接続のための接触領域503を有している。例えば、粘着性物質の層または両面粘着テープのようなスペーサー504(図18B)によって溝506が定められ、センサーに試料室が設けられる。図18C(電極側を上面として示すため、図18Aおよび18Bに対する表裏反転図)に示すように、2つの対(または対/参照)電極510、512が、第2基板508上に形成されている。この複数の対電極の配置により、上述のように、指示電極機が提供される。対電極510、512は、それぞれ、外部電子機器との接続のための接触領域511、513を有する。第2基板508を裏返し、スペーサー504を介して第1基板500上に配置して、作用電極502と2つの対電極510、512とが溝506の領域で対向するようにする。

【 0 1 9 8 】

いくつかの例においては、溝506の入口514に最も近い対電極510の試料室内における表面積は、もう一方の対電極512の少なくとも2倍であり、また少なくとも5倍または10倍であってもよい。非浸出性または拡散性の酸化還元媒介剤および/または第2の電子移動剤は、上述のように、溝506に対応する領域において、第1または第2基板500、508のいずれかに設けることができる。

【 0 1 9 9 】

作用電極および対電極は、溝領域全体（ただし、2つの対電極間の微小な空間は除く）を覆うように形成することができる。本実施形態においては、試料室および測定域が効率的にも同一であり、同体積を有している。別の実施形態においては、測定域は、例えば、試料室体積の80%または90%を占める。同様のセンサーが、1つの対電極または3つ以上の対電極を用いても作製できることは理解されるであろう。さらに、センサーに複数の作用電極を設けてもよいことも理解されるであろう。

【 0 2 0 0 】

薄膜センサーの作成方法の一例を、図18A～18Cに示したセンサー配置に関して述べるが、この方法は、上述のセンサー配置を含む、その他の種々のセンサー配置を作製する際にも使用できる。プラスチック基板のような基板を設ける。基板は、単一のシートまたはウェブ上の連続するロールとすることができる。この基板は、単一のセンサーの作製にも、複数のセンサーの作製にも使用できる。複数のセンサーは、複数の作用電極1010および単一または複数の対電極1020として、基板1000上に形成できる。いくつかの実施形態においては、基板に刻み目をつけて折りたたみ、作用電極1010と対電極1020とを寄せ合ってセンサーを形成することができる。いくつかの実施形態においては、図31Aに示すように、個々の作用電極1010（および、離れた部位においては、対電極1020）を、互いに隣り合うように基板1010上に形成することができ、図31Aに示すように、廃材を低減することができる。別の実施形態においては、個々の作用電極1010（および、離れた部位においては、対電極1020）を、図31Bに示すように、分離させることができる。残る工程を複数のセンサーの製造に関して述べるが、これは、個々のセンサーの形成用に容易に改変できる。

【 0 2 0 1 】

炭素または他の電極材料（例えば、金または白金等の金属）を基板上に形成し、各センサーに作用電極を設ける。炭素または他の電極材料は、炭素または金属インクの印刷、蒸着、および他の方法を含む種々の方法により堆積できる。

【 0 2 0 2 】

また、非導電性インクのような非導電性材料を、作用電極近傍に任意に形成し、試料液の流路に沿って平面を設けることができる。非導電性材料は、毛管作用による充填を容易にするための平滑面の形成および／または作用電極近くに気泡が取り込まれる可能性の低減に適している。この非導電性材料は、有着色でも無着色でもよく、印刷またはその他の方法によって基板上に形成できる。非導電性材料は、作用電極の形成前または形成後に堆積することができる。

【 0 2 0 3 】

单一または複数の対電極を、基板上に形成する。対電極は、炭素または他の電極材料を基板上に堆積することにより形成される。一実施形態においては、対電極の材料は、A g / A g C l インクである。対電極の材料は、印刷または蒸着を含む種々の方法により堆積できる。いくつかの実施形態においては、複数の対電極が異なる材料を用いて形成され、および／または、電極の1つが対電極または対／参照電極であり、もう一方の電極が参照または対／参照電極である。一実施形態においては、作用電極をポリマーシートまたはウェブの第1ハーフに形成し、対電極をポリマーシートまたはウェブの第2ハーフに形成して、シートまたはウェブを折り畳み、作用電極および対電極が対向配置となるように重ね合わせる。

【 0 2 0 4 】

第2の非導電性材料を、対電極近隣および／または対電極間に配置し、試料液の流路に沿って平面を設けてもよい。このことは、試料室表面を平面化するため、試料室の一部となる対電極間の領域において特に望ましい。非導電性材料は、毛管作用による充填を容易にするための平滑面の形成および／または対電極近くに気泡が取り込まれる可能性の低減に適している。この非導電性材料は、有着色でも無着色でもよく、印刷またはその他の方法によって基板上に形成できる。非導電性材料は、作用電極の形成前または形成後に積層してよい。

【 0 2 0 5 】

粘着性のスペーサーを、基板／作用電極および基板／対電極の少なくとも1つの上に形成することができる。粘着性のスペーサーは、粘着性物質の単一層または両面の粘着テープ（例えば、相対する面に粘着性物質が配置されたポリマーキ

ヤリヤフィルム (polymer carrier film) であってもよい。溝を形成するため、1 以上の剥離ライナーを任意に備えたスペーサーを、基板に配置する前に裁断し（例えば、打抜き）、溝に相当する部分を取り除いてもよい。あるいは、溝領域を定めるパターンに従い、基板上に粘着性物質を印刷するか、または他の方法により配置してもよい。

【 0 2 0 6 】

一般に、スペーサーの厚みは、作用電極と対電極の間隔を決定する。センサーにおいてこの間隔が一定であることが要される場合（例えば、クロメトリーによる測定）、スペーサーの厚みが一定であることが重要となる。個々のセンサーおよび／または一バッチ中の個々のセンサーにおいて、厚みの相違が±5 % の範囲を超えないことが好ましい。

【 0 2 0 7 】

非浸出性または拡散性の酸化還元媒介剤および／または第2の電子移動剤を、少なくとも試料室の領域において、基板上に配置する。これらの成分のいずれか一方または両方が非浸出性である場合、非浸出性の成分は作用電極上に配置しなければならない。これらの成分のいずれか一方または両方が拡散性である場合、拡散性の成分は、溝領域における基板のいずれかの面に配置することができる。酸化還元媒介剤および／または第2の電子移動剤は、スペーサーの配置前または配置後に、基板上に個々または一緒に配置できる。酸化還元媒介剤および／または第2の電子移動剤は、例えば、スクリーン印刷、インクジェット印刷、吹き付け、ペインティング、整列および／または近接した電極の行または列に沿ったストリッピング等を含む種々の方法によって配置できる。また、他の成分、例えば、界面活性剤、ポリマー、ポリマーフィルム、防腐剤、バインダー、緩衝剤、および架橋剤を、個別に、あるいは酸化還元媒介剤および／または第2の電子移動剤と共に配置してもよい。

【 0 2 0 8 】

スペーサー、酸化還元媒介剤、および第2の電子移動剤を配置した後、基板を折り疊んでセンサーを形成することができる。基板面は、スペーサーの粘着性物質によって接合される。面同士を接合させた後、例えば、打抜き、カッティング

、スリッティング、または基板材料の余剰部分を切り捨て、個々のセンサーを分離させるその他の方法を含む種々の方法によりセンサーを裁断することができる。いくつかの実施形態においては、複数の方法を組み合わせて用いることができる。例えば、いくつかの主な形状 (features) を打抜き、センサーの残りの部分をスリッティングにより切断するようにしてもよい。これに代わる例としては、センサー部品（例えば、図 18 A および図 18 C で示される部品）をまず基板より切り取り、次にこれらを寄せ合い、2つの部品をスペーサーの粘着性物質によって付着させて接合することによりセンサーを形成する。

【 0 2 0 9 】

図 18 A ~ 図 18 C に示すセンサーの実施形態は、頂部充填式センサーの一例である。これに代わるセンサー構造が、図 19 A ~ 図 19 C に示されている。これは、側面充填式センサーである。図 19 A は、作用電極 522 を備えた第 1 基板 520 を示している。図 19 B は、溝 526 を定めるスペーサー 524 を示している。図 19 C (電極を示すため、図 19 A および 19 B に対する表裏反転図) は、3つの対 (または対/参照) 電極 530, 532, 534 を備えた第 2 基板 528 を示している。

【 0 2 1 0 】

このセンサーは、先に述べたように作製できる。対電極を対称的に配置したことで、右利き、左利きのいずれの人にも便利なように、センサーを左右いずれの側からでも充填できるようになった。しかしながら、同様のセンサー配置が、1、2、または4以上の対電極および/または2以上の作用電極を用いても形成可能であることは理解されるであろう。扇形切り欠き領域 536, 538 は、例えば、打抜きによって形成してもよく、少なくともいくつかの例においては、再現可能な溝長さを提供するため、正確に制御してもよい。これに代わる配置として、センサーの側面を直線状に形成し、例えばギャングアーバブレードシステム (gang arbor blade system) を用いて、基板を平行方向に裁断することによって、基板の残り部分および/または他のセンサーよりセンサーを裁断することが挙げられる。図 19 A, 19 B, および 19 C に示すように、センサーの縁部により、試料室および/または測定域の縁部が定められる。切片間の距離を正確に制

御することにより、試料室体積の変動性が、しばしば低減される。いくつかの例においては、平行な切片が最も簡単に再現されるため、これらの切片は互いに平行であることが好ましい。

【0211】

図20A、20B、および21Cは、側面充填式センサー配置の別の例を示すものである。図20Aは、作用電極542を備えた第1基板540を示している。図20Bは、溝546を定めるスペーサー544を示している。図20C（図20Aおよび20Bに対する表裏反転図）は、3つの対（または対／参照）電極550、552、554を備えた第2基板548を説明している。

【0212】

図21A、21B、および21Cは、頂部充填式センサー配置の別の例を示すものである。図21Aは、作用電極562を備えた第1基板560を示している。図21Bは、溝566を定めるスペーサー564を示している。図21C（図21Aおよび21Bに対する表裏反転図）は、2つの対（または対／参照）電極570、572を備えた第2薄膜基板568を説明している。通気孔574（図21Cにおいて陰影領域として表示）が、第2基板を貫通して形成されている。図示している実施形態においては、この通気孔574は、対電極を備えた基板568のみを貫通し、また任意にスペーサー564を貫通する。本実施形態においては、通気孔を、例えば、基板の一部を打ち抜くことによって形成してもよい。この打抜きにより、少なくとも1つの対電極の一部分を除去してもよいが、溝内での試料との接触、ならびにセンサーの他端における接触子との接続に十分な量の対電極を残しておくべきである。別の実施形態においては、通気孔574を、全ての層を貫通するか、または第1基板を貫通し、第2基板を貫通しないように形成してもよい。

【0213】

異なる形状を有する他の実施形態が、図22A、22B、および22Cに説明されている。図22Aに示すように、このセンサーは、少なくとも1つの作用電極580を備えた第1基板579を有している。図22Bに示すように、センサーはまた、スペーサー581を有しており、溝582がスペーサー581内に形

成されている。図22C(図22Aおよび22Bに対する表裏反転図)に示すように、センサーは、さらに、2つの対電極584、585を備えた第2基板583を有している。通気開口586は、一般に、全ての層を貫いて裁断されており、センサーの側面より伸びている。いくつかの実施形態においては、通気開口およびセンサーの前部587は、再現可能な通気開口とセンサーの前部587との距離で同時に裁断され、溝582と作用電極580の長さを再現可能にしている。図22A、22B、および22Cは、あらゆるセンサー配置に使用可能な、他の特徴をさらに示している。センサーへの流体の導入を容易にするため、溝582の充填用開口部にへこみ(indentation)588を形成してもよい。この形態においては、液体は平面に提供されるのではなく、吸い上げまたは毛管現象による溝(すなわち、試料室)の充填を助ける、へこみを備えた面に提供される。この構成によれば、センサーの使用者が試料収集時に溝を塞いでしまう可能性も低減できる。平面センサーは、センサーの先端を沿層方向(edgewise)に皮膚に押しつけることにより、塞がれる可能性がある。

【0214】

図23A、23B、および23Cは、側面充填式センサー配置の別の例を示すものである。図23Aは、作用電極642を備えた第1基板640を示している。図23Bは、溝646を定めるスペーサー644を示している。図23C(図23Aおよび23Bに対する表裏反転図)は、3つの対(または対/参照)電極650、652、654を備えた第2基板648を示している。このセンサーは、基板を直線状に裁断することにより形成できる。図31Aに示すように、センサーを互いに隣接するように設けることができ、これにより廃材を減らすことができる。溝646の長さは、一般に、センサーの側面656、658に沿った、平行な2つの切片によって定められる。特にセンサーが互いに隣接して形成されている場合、任意に得られる他の製造上の利点は、酸化還元媒介剤および/または第2の電子移動剤の連続的な流れを隣接するセンサーの行または列に沿ってストリッピングすることにより、これらの成分溝内に配置できることである。これにより、酸化還元媒介剤および/または第2の電子移動剤を個々の溝内に個別に配するといった他の方法に比べ、これらの成分をより効率的にかつ無駄無く配置

できる。

【 0 2 1 5 】

図 24 A、24 B、および 24 C は、別のセンサー構成を説明するものである。図 24 A に示すように、このセンサーは、少なくとも 1 つの作用電極 602 を備えた第 1 基板 600 を有している。図 24 B に示すように、センサーはまた、スペーサー 604 を有しており、溝 606 がスペーサー 604 内に形成されている。図 24 C (図 24 A および 24 B に対する表裏反転図) に示すように、センサーはさらに、2 つの対電極 610、612 を備えた第 2 基板 608 を有している。センサーはまた、例えば、スロット 614 またはセンサー本体からの延長部 616 のような、いずれの側を試料に隣接させるべきかを使用者に知らせる指示器を備えていてもよい。これは、試料が特定の側から導入された時のみ、正確なセンサーの読みが得られる場合に特に重要である。

【 0 2 1 6 】

図 24 B はまた、あらゆるセンサー配置に使用できる、任意に選択できる他の特徴をさらに説明している。図示によると、試料室 606 は直線を用いて形成されておらず、試料室内に拡張領域 618 が設けられている。これにより、より大きな試料室が、より大きな開口部を形成することなく提供される。この拡張領域は、円形、正方形、矩形、およびその他の規則形および不規則形を含むあらゆる形状とすることができます。

【 0 2 1 7 】

図 25 は、組立式センサーの一例であり、さらに別のセンサー配置を側面充填式センサー 620 について説明するものである。このセンサーは、試料室 626 の開口部がどこに設けられているかを使用者に示す、センサー本体 624 からの拡張部 622 を有している。

【 0 2 1 8 】

任意に選択できる一特徴が、測定器内部より見たセンサーを、端部側を前面にして示した図 32 に示されている。図 32 は、センサー 1110 の残りの部分から測定器内に伸びている第 1 基板 1120 および第 2 基板 1130 を示している (すなわち、図 32 において、部分 1140 は基板 1120 および 1130 側に

向かって凹んでいる）。この形態の例が、図18A～18Cおよび図24A～24Cに示されている。一般に、センサー1100は、センサー1100の電極の接触領域（例えば、図18Aおよび18Cにおける領域503、511、および513）と接触するコンタクトパッド（図示せず）を備えた測定器1110に連結される。接触領域を有するセンサー1110の端部を、測定器1110に滑り込ませることができる。測定器1110のコンタクトパッドを、センサーにおける正しい接触領域と接触させ、作用電極および対電極を正しく測定器と連結することが、一般に重要となっている。いくつかの例においては、第1基板1120上の作用電極のための接触領域の幅w1が、対電極を備えた第2基板1130の接触領域の幅w2と相違するように構成される。この構造を有する電極形態の例が、図18A～18Cおよび図24A～24Cに示されている。測定器1110へのセンサー1100の適切な挿入を保証するため、測定器1110は、不適切な方向へのセンサーの挿入を防止または阻害する隆起領域1140を備えていてもよい。例えば、図32に示すように、第2基板1130の接触領域の幅w2を、第1基板1120の接触領域の幅w1よりも広くすることができる。この例において、隆起領域1140は、隆起領域1140を有する面1150に第1基板1120が隣り合うようなセンサーの挿入を妨げないが、第2基板1130が隆起領域1140を有する面1150に隣り合うのを防止または阻害するように配置されている。隆起領域以外の物体を用い、使用者を測定器への正しいセンサーの導入に導くことも可能である。

【0219】

(一体型の試料採取および分析物測定装置)

少量の試料をセンサー本体より採取および／または輸送する多くのアプローチが、当該技術分野で知られている。これらの例として、例えば、米国特許第5,746,217号；第5,820,570号；5,857,983号；および第5,879,311号が挙げられるが、それらは引照をもって本明細書に組み込まれている。これらの試料採取および／または輸送方法は、全て本発明のセンサーにも使用できる。

【0220】

本発明の好ましい実施形態において、本発明の原理により構成された分析物測定装置52は、上述のようなセンサー20を試料採取手段50と組み合わせて備え、一体型の試料採取および測定装置を提供する。図6に示す試料採取手段50は、例えば、たわみ得る弾性細片56（または、バネ等の他の類似する部材）を取り付けられた、ランセットのような皮膚穿孔部材54を備え、このたわみ得る弾性細片56ランセットを押してランセットを患者の皮膚に突き刺し、血液流を生じさせる。

【 0 2 2 1 】

弾性薄片56が開放されると、皮膚穿孔部材54が引っ込む。部材54に穿孔された皮膚の領域から流れる血液は、分析物の分析のため、例えば吸収材34の吸上げ作用によってセンサー20に輸送することができる。次に、分析物測定装置52を図示していない読取装置内に配置する。電気的分析手段によって分析物濃度を測定するため、この読取装置によって、電極タブ23、25がクーロメーターまたはその他の電気化学分析装置に接続される。

【 0 2 2 2 】

本発明の好ましい実施形態においては、一体型の試料採取および測定装置は、ランセットと測定細片とを有する切開器具（lancing instrument）とを備えている。切開器具は、好ましくは、積極的な立上げ（active cocking）を要する。使用者に、使用前に装置を立上げるよう要求することにより、ランセットを不注意で作動させる危険性を最小限に抑えることができる。

【 0 2 2 3 】

切開器具は、十分な圧力でしっかりと皮膚に押し当てられると、自動的に作動することが好ましい。当該技術分野において既に知られているように、孔が形成された皮膚の部位の周囲に圧力を加えることにより、より大きな体積の血液または間隙液等の体液試料が得られる。例えば、先に述べたインテッグ（Integ）およびアミーラ（Amira）に対する米国特許を、ベクトンディッケンソン（Becton Dickinson）が販売している切開器具の先端デザインと併せて参照されたい。これらの切開器具は全て、切開部位を取り囲む、突出したリング部を有し、このリング部により圧力を加えて傷口から試料を取り出している。しかしながら、これ

らの装置はいずれも、傷口に対して十分な圧力を加えて試料を取り出すことを使用者に要求するものであり、また、これらの切開器具はいずれも使用者がボタンを押すことにより作動する。適切な圧力トリガーの設計は、当業者には周知である。

【 0 2 2 4 】

切開器具は、使用者が皮膚に対するランセットの穿孔深さを調節できるように構成されていることが好ましい。このような装置は、ボーリングガーマンハイム (Boehringer Mannheim) やパルコ (Palco) といった会社より、既に商業的に入手可能である。この特徴により、使用者が、身体の部位により、または使用者により異なる皮膚厚、皮膚耐久度、または痛覚感受性の違いに従って切開器具を調節することが可能になる。

【 0 2 2 5 】

さらに好ましい実施形態においては、切開器具およびテスト結果読取装置が一体化され、単一の装置を形成している。装置を作動させるためには、使用者はただ、測定細片および切開装置を有する使い捨てカートリッジを上記一体型装置に挿入し、切開装置を立上げ、切開装置を皮膚に押し当てて作動させ、測定結果を読み取ればよい。このような一体型の切開装置およびテスト結果読取装置により、使用者のテスト処理が単純化され、また体液の取り扱いも最小限ですむ。

【 0 2 2 6 】

図 26 は、一体型試料採取およびセンサー装置 700 の他の例を示すものである。一体型試料採取およびセンサー装置 700 は、ハウジング 702、皮膚穿孔部材（例えば、ランセット）704、穿孔／収集孔 706、任意に取り外し可能なセンサー 708、センサーガイド 710、および皮膚穿孔部材用の引戻し機構 (retraction mechanism) 714 を備えている。この装置 700 は、（例えば、皮膚穿孔部材 704 とセンサー 708 を取り外し可能に形成することによって）再使用可能に設計でき、または1回のみ使用するようにも設計できる。

【 0 2 2 7 】

ハウジング 702 は、金属およびプラスチックを含む種々の材料で形成できる。ハウジング 702 は、ハウジングの各部を一体に保持するためのヒンジ 716

または他の構成（例えば、接着部または連結部）を備えていてもよい。

【 0 2 2 8 】

穿孔／収集孔 7 0 6 がハウジング 7 0 2 内に設けられ、皮膚穿孔部材 7 0 4 がこの孔 7 0 6 を通って伸び、使用者の皮膚を穿孔するのを可能にし、これにより血液（または、他の体液）の流れを生じさせる。センサー 7 0 8 もまた、孔 7 0 6 の端部または外部にまで伸び、センサー先端の開口部（図示せず）を通して血液を収集する。これにより、使用者が、装置 7 0 0 を動かすことなく皮膚を穿孔し、液体試料を収集することが可能となる。あるいは、皮膚穿孔部材 7 0 4 およびセンサー 7 0 8 に、別の孔を設けるようにしてもよい。センサーが挿入されてハウジング内を通る場合にセンサー 7 0 8 を案内するため、および／または試料収集時にハウジング内でセンサーを支持するため、センサーガイドをハウジング 7 0 2 に形成してもよいし、または付与してもよい。

【 0 2 2 9 】

皮膚穿孔部材 7 0 4 は、皮膚穿孔部材 7 0 4 の立上げと解放を可能にする機構を備えた作動装置（図示せず）を備えていてもよく、または皮膚穿孔部材を外部から作動させててもよい。例えば、皮膚穿孔部材の立上げおよび／または解放を引き起こす機構を備えたセンサー読取装置（図示せず）または他の装置を、試料採取およびセンサー装置に連結してもよい。

【 0 2 3 0 】

装置 7 0 0 の引戻し機構 7 1 4 は、例えば、使用者の皮膚を穿孔した後、皮膚穿孔部材 7 0 4 をハウジングに引き戻すバネまたは弾性金属ストリップであってよい。これにより、妨げられない試料の収集および／または使用者の皮膚のさらなる穿孔の防止が可能になり、体液または他の有害な作用物質の移動を低減または防止できる。あるいは、皮膚穿孔部材の引き戻しは、外部の装置または機器を用いても達成できる。

【 0 2 3 1 】

操作の一例としては、皮膚穿孔部材 7 0 4 を立上げ、次に皮膚穿孔部材 7 0 4 を解放して、皮膚穿孔部材 7 0 4 が穿孔／収集孔 7 0 6 を通ってハウジング 7 0 2 の外部に伸び、使用者の皮膚を穿孔することが挙げられる。皮膚穿孔素子 7 0

4は、センサーを任意に押しのけてハウジング外部に伸びる。皮膚穿孔素子704は、引戻し機構714を用いてハウジング内に引戻される。皮膚穿孔素子が引戻されると、センサーは、センサー708の開口部を通して、穿孔された皮膚より試料を収集する。

【 0 2 3 2 】

センサー読取装置を用いる場合、センサー読取装置を、センサーの接触端と連結するよう構成してもよい。センサー読取装置は、センサーの電極に電位および／または電流を提供するため、ポテンシオスタットまたは他の構成部品を備えていてもよい。センサー読取装置はまた、分析物濃度をセンサー信号から測定するためのプロセッサー（マイクロプロセッサーまたはハードウェア）を備えていてもよい。センサー読取装置は、表示装置、または表示装置をセンサーに連結するための接続口を備えていてもよい。表示装置は、センサー信号および／または、例えば、分析物濃度、分析物濃度の変化速度、および／または限界分析物濃度の超過（例えば、低血糖または高血糖として示される）を含む、センサー信号より測定された結果を表示する。センサー読取装置は、一体型の試料採取およびセンサー装置と組み合わせて用いてもよいし、またはセンサーの接触子をセンサー読取装置の接触子とを接続して、センサーのみと共に用いてもよい。

【 0 2 3 3 】

（センサーの作動）

本発明の電気化学センサーは、電位を印加して、または電位の印加なしに作動させることができる。一実施形態においては、電気化学反応が自然に起こり、作用電極と対電極との間に電位を印加する必要はない。

【 0 2 3 4 】

別の実施形態においては、作用電極および対電極との間に電位を印加する。ただし、電位が一定である必要はない。必要とされる電位の大きさは、酸化還元媒介剤によって左右される。電極が自ずと均衡状態となる電位または外部バイアスの印加により均衡状態となる電位、および分析物が電気分解される電位は、一般に、電気化学反応を完了またはほぼ完了させるのに十分な大きさであるが、測定する信号に影響を及ぼす尿酸塩、アスコルビン酸塩、およびアセトアミノフェン

等の妨害物質の電気化学反応を著しく誘発しない程度の酸化を起こす大きさであることが好ましい。非浸出性の酸化還元媒介剤に関しては、電位は、一般に、標準カロメル電極 (S C E) に対して約 - 350 m V ~ 約 + 400 m V である。好ましくは、酸化還元媒介剤の電位は、S C E に対して約 + 100 m V よりも負の電位、より好ましくは 0 m V よりも負の電位、最も好ましくは約 - 150 m V よりも負の電位である。

【 0 2 3 5 】

外部電位を印加する場合、電位の印加は、試料を試料室に配する前または後のいずれに行ってもよい。測定域が試料室の一部のみを占める場合、試料室の充填時に測定域を通過する試料が電気分解されるのを防止するため、試料が試料室に完全に配置された後に電位を印加することが好ましい。あるいは、測定域が試料室のほとんどまたは全てを占める場合には、試料室の充填前または充填中のいずれにおいても、アッセイの正確さを損なうことなく、電位を任意に印加することができる。電位が印加され、かつ測定域に試料が存在する場合、作用電極と対電極との間に電流が流れる。電流は、少なくとも部分的に、試料中の分析物の電気分解に起因する。この電気化学反応は、酸化還元媒介剤および任意に用いられる第 2 の電子移動剤を介して起こる。多くの生体分子 B に関し、プロセスは下記の反応式で表される。

【 数 1 】



【 0 2 3 6 】

生化学物質 B が、適切な酵素の存在下において、酸化還元媒介剤種 A によって C に酸化される。次に、酸化還元媒介剤 A が電極で酸化される。電子が電極に種集され、その結果生じる電流を測定する。測定された電流には、作用電極と対電極との間での拡散性酸化還元媒介剤の往復に少なくとも部分的に起因して測定さ

れたバックグラウンド電荷によって生じたバックグラウンド電流が含まれていることがある。このバックグラウンド電流は、上述のように、最小化または明確化が可能である。

【 0 2 3 7 】

一例として、本発明のセンサーは、グルコースオキシダーゼの存在下において、グルコース分子と、2個の $[O_s(dmo-phen), (NMI)Cl]$ $^{+}$ 陽イオン（ただし、 $dmo-phen$ は 4, 8-ジメトキシフェナントロリン、 NMI は N -メチル-イミダゾール）とが、2個の $[O_s(dmo-phen), (NMI)Cl]$ $^{+}$ 陽イオン、2個のプロトン、および、例えば、グルコノラクトンまたは他のケトンのようなグルコース酸化物を生成する反応に基づいている。存在するグルコースの量は、 $[O_s(dmo-phen), (NMI)Cl]$ $^{+}$ 陽イオンを $[O_s(dmo-phen), (NMI)Cl]$ $^{+}$ 陽イオンへと電気酸化し、通過した総電荷量を測定することにより分析される。

【 0 2 3 8 】

当業者であれば、同じ結果、すなわち酸化還元媒介剤を取り込む反応経路による分析物の電気分解をもたらす異なる反応機構が多数存在することを認識するであろう。式(1)および(2)は、このような反応の非限定的な例である。

【 0 2 3 9 】

[クーロメトリー]

本発明の好ましい実施形態においては、分析物の濃度測定にクーロメトリーを用いる。この測定方法は、アッセイの過程において間隔をあけて得られた電流の測定値を利用して分析物濃度を測定するものである。これらの電流の測定値を時間に渡って積算し、電極へまたは電極から移動した電荷量 Q を求める。そして Q を用い、下記の式によって分析物濃度 (C_A) を算出する。

$$C_A = Q / n F V \quad (3a)$$

式中、 n は分析物の電気分解に要する電子当量数 (number of electron equivalents) であり、 F はファラデー定数 (当量当たり約 96,500 クーロン)、 V は測定域中の試料の体積である。拡散性の媒介剤を使用する場合は、分析物濃度は下記の式のよって求められる。

$$C_A = (Q_{tot} - Q_{back}) / n F V \quad (3b)$$

式中、 Q_{tot} は測定期間中に移動した総電荷量、 Q_{back} は分析物以外によって移動した電荷、例えば、作用電極と対電極との間を拡散性媒介剤によって移動した電荷である。少なくともいくつかの例において、センサーは、バックグラウン電荷が分析物量の電気分解により生じる電荷の大きさの 5 倍を上回らないように構成されている。好ましくは、バックグラウンド信号は、分析物の電気分解により生じる電荷の 200%、100%、50%、25%、10%、または 5% を上回らない。

【0240】

分析物の電気分解により生じる信号に対するバックグラウンド信号の比率を求める方法の一例を、対向する電極対に関して以下に述べる。酸化還元媒介剤の往復が付加電位によって弱められない場合、酸化還元媒介剤の往復により生じた電荷は、下記の式によって表される。

$$Q_{back} = (A F D_x C_x / d) (t n_x) \quad (4)$$

式中、 A は作用電極の面積、 F はファラデー定数（約 96,500 クーロン／当量）、 D_x は酸化還元媒介剤の有効拡散係数、 C_x は測定域における酸化還元媒介剤濃度、 d は対向する電極間の離間距離、 t は測定時間、 n_x は酸化還元媒介剤により獲得または損失した電荷数である。

【0241】

加えて、分析物、例えばグルコースの電荷数は、分析物の電気酸化が測定時間内に約 90% 完了した場合には、下記の式によって表される。

$$Q_c = A d (0.90) C_c n_c F \quad (5)$$

式中、 A は作用電極の面積、 d は離間した対向する電極間の距離、 C_c はグルコース濃度、 n_c は分析物の電気分解に要する電子数（例えば、グルコース分子当たり 2 個の電子）、 F はファラデー定数である。 C_c が 5 mM（または 5×10^{-6} モル／cm³）、 t が 60 秒、 n_c が 2、 n_x が 1 の場合、分析物の電気分解による電荷に対する酸化還元媒介剤による電荷の比率は、下記の式によって表される。

$$Q_{back} / Q_c = (D_x C_x / d^2) (t n_x / (0.90 n_c C_c)) = (D_x C_x / d^2) \times (6.7 \times 10^{-6})$$

①

例えば、 Q_{back}/Q_c の比率が5の場合、 $(D_x C_x)/d^2$ は 7.5×10^{-7} モル/（cm³秒）である。また、例えば、 Q_{back}/Q_c の比率が1の場合、 $(D_x C_x)/d^2$ は 1.5×10^{-7} モル/（cm³秒）である。さらにまた、上記比率が0.1の場合、 $(D_x C_x)/d^2$ は 1.5×10^{-8} モル/（cm³秒）である。よって、所望の比率に従い、 D_x 、 C_x 、およびdを適切に選択することにより、所望の比率を有するようにセンサーを構成できる。例えば、酸化還元媒介剤濃度を低下させてもよい（すなわち、 C_x を減少させてよい）。これに代わるものとして、またはこれに加えて、酸化還元媒介剤の拡散を、例えば、対電極へ向かう拡散性媒介剤の流れに対してバリヤを設けることにより（すなわち、酸化還元媒介剤の有効拡散係数である D_x を低減することにより）、低減させてもよい。その他のセンサー構成も、分析物により生じる信号に対するバックグラウンド信号の比率を制御するのに適している。これに関しては、以下に述べる。

【0242】

バックグラウンド電荷 Q_{back} は、種々の方法により明らかにできる。例えば、拡散性酸化還元媒介剤を限られた量だけ使用すること、対電極へ向かう酸化還元媒介剤の拡散を制限する膜を対電極の上方に設けること、または作用電極と対電極との間の電位差を比較的小さくすることによって、 Q_{back} を小さくすることができる。 Q_{back} の低減に適したセンサー構成および方法の他の例としては、酸化還元媒介剤の反応速度が、作用電極よりも対電極において著しく速いセンサー、酸化還元媒介剤を作用電極上に固定化すること、対電極および対/参照電極における反応により酸化還元媒介剤を対電極および対/参照電極上に固定化させること、または酸化還元媒介剤の拡散を遅らせることといった、既に説明した構成や方法が挙げられる。

【0243】

あるいは、センサーを個別またはバッチ単位で校正し、 Q_{back} の検量線または Q_{back} の値を求めてよい。他の選択肢としては、分析物の電気分解に必要なアイテム、例えば、第2の電子移動剤を欠いた第2の電極対を設け、この第2の電極対からの信号全体が Q_{back} に相当するようにすることである。

【0244】

クロメトリーによる測定においては、分析物の少なくとも20%が電気分解される。好ましくは、分析物の少なくとも50%、より好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは少なくとも90%が電気分解される。本発明の一実施形態においては、分析物は完全、または、ほぼ完全に電気分解される。電気化学反応中に得られた電流測定値より電荷を算出することができ、分析物濃度は、式(3a)または式(3b)を用いて求められる。電気化学反応の完了は、一般に、電流が定常状態の値に達することによって示される。これは、分析物の全て、または、ほぼ全てが電気分解されたことを示すものである。このタイプの測定においては、一般に、分析物の少なくとも90%が電気分解され、好ましくは分析物の少なくとも95%が電気分解され、より好ましくは分析物の少なくとも99%が電気分解される。

【0245】

クロメトリーに関しては、一般に、分析物が速やかに電気分解されることが望ましい。電気化学反応の速度は、電極間に印加される電位や反応(1)および(2)の速度論(kinetics)を含むいくつかの要素に左右される(その他の重要な要素としては、測定域のサイズおよび測定域における吸収材の存在が挙げられる)。一般に、電位が大きいほど、セルを通る電流は大きくなり(ただし、輸送限度の最大値まで)、したがって、概して反応はより速やかに起こる。しかし、電位が大きすぎると、他の電気化学反応により測定値に著しい誤差が生じる。一般に、分析物が5分未満でほぼ完全に電気分解されるよう、試料中の分析物の予測濃度に基づいて、特定の酸化還元媒介剤および任意に使用される第2の電子移動剤のみならず、電極間の電位も選択される。分析物は、約2分以内、より好ましくは約1分以内にほぼ完全に電気分解されるのが好ましい。

【0246】

本発明の別の実施形態においては、分析物を部分的にのみ電気分解する。部分的な反応時における電流を測定し、次に当業者に公知の数学的方法を用いて外挿して、分析物の完全またはほぼ完全な電気分解についての電流曲線を求める。この曲線の積分によって、分析物が完全またはほぼ完全に電気分解された場合に通

過する電荷量が得られ、式(3a)または(3b)を用いて分析物濃度が算出される。

【0247】

クロメトリーには、測定される試料の体積が既知でなくてはならないとの欠点がある。しかしながら、クロメトリーは、例えば、測定値の温度依存性がない、測定値の酵素活性度依存性がない、測定値の酸化還元媒介剤活性度依存性がない、試料中の分析物の消耗に起因する測定値の誤差がないといった利点を有しているため、少量の試料の分析に好まれる方法である。既に説明したように、クロメトリーとは、分析物の完全またはほぼ完全な電気分解の間に、通過または通過すると考えられる電荷の量を測定する方法である。クロメトリーを用いる一方法には、電気分解中に作用電極と対電極との間に生じる電流を2回以上測定することが含まれる。電流が定常状態に達すると、電気分解が完了する。次に、試料の電気分解に使用された電荷を、測定された電流の時間積分とあらゆるバックグラウンド信号の明確化によって算出する。電荷は試料中の分析物量に直接関係するため、測定値の温度依存性はない。さらに、酵素の活性は、測定値には影響を及ぼさず、測定値を得るために要する時間のみに影響を及ぼす（すなわち、活性の低い酵素によれば、試料を完全に電気分解するのに長い時間がかかる）ため、時間の経過に伴う酵素の減衰により分析物濃度の測定が不正確となることはない。最後に、電気分解による試料中の分析物の消耗は、誤差原因となるものではなく、むしろこの方法においては対象物となるものである。（しかしながら、電解曲線が、既知の電気化学的原理に基づいて部分的な電解曲線から外挿される場合、分析物は完全に電気分解される必要はない）。

【0248】

[クロメトリー以外によるアッセイ]

クロメトリーによるアッセイは有益であるが、当業者であれば、本発明のセンサーにおいては、ポテンシオメトリー、アンペロメトリー、ボルタンメトリー、およびその他の電気化学的方法を利用して試料中の分析物濃度を測定してもよいことを認識するであろう。これらのクロメトリー以外の方法によって得られる測定値は、クロメトリーで得られる測定値のように温度の影響を受けないわ

けではない。

【 0 2 4 9 】

さらに、これらのクロメトリー以外の電気化学的方法によって得られる測定値は、センサーに供給された活性酵素の量の影響を受けやすい。酵素が時間の経過により不活性化または崩壊した場合、結果として得られる測定値はその影響を受ける。したがって、酵素が非常に安定でない限り、このセンサーの保管寿命には限界がある。

【 0 2 5 0 】

最後に、定常状態のアンペロメトリーのようなクロメトリー以外の電気化学的方法によって得られる測定値は、測定期間中に分析物および／または酸化還元媒介剤の一部が電気分解されると悪影響を受ける。測定過程において分析物および／または酸化還元媒介剤の比較的小さい部分のみが電気分解されるよう、分析物および／または酸化還元媒介剤が十分に存在しない限りは、正確な定常状態の測定値は得られない。1 μ L以下の試料サイズにおいては、これは困難である。

【 0 2 5 1 】

いくつかの例においては、アンペロメトリーまたはボテンシオメトリーによる測定方法のような、クロメトリー以外によるアッセイを利用することが望ましい。例えば、クロメトリーでは、測定される試料の体積が既知であることが必要である。さらに、小体積センサーの測定域内における試料の体積（すなわち、1 μ L以下）は、測定域の1以上の寸法についての製造公差が著しく相違する場合、正確に再現することが困難である。

【 0 2 5 2 】

クロメトリーによる測定に関して述べたように、電極間における酸化還元媒介剤の往復の結果生じるバックグラウンド信号は、薄層電気化学セルにおける1 μ L以下の試料のアンペロメトリーまたはボテンシオメトリーによるアッセイにおいても、測定誤差の原因となり得る。一般に、測定期間中における媒介剤の電極対間の往復は10回を超えないことが望ましく、好ましくは平均して1回以下、より好ましくは平均して0.1回以下である。バックグラウンド信号に起因する誤差を低減するため、クロメトリーによる測定に用いたものと同様の、場合

によっては同一の、方法およびセンサー形態を用いることができる。上述したあらゆる方法および構成、例えば、電気化学的アッセイを比較的低い付加電位で行うこと、分析物を負の付加電位で電気酸化するか、または正の付加電位で電気還元すること、酸化還元媒介剤が比較的ゆっくりと反応する（特に、作用電極における酸化還元媒介剤の反応と比較した場合）対電極を用いること、および／または対電極において不可逆的に反応する酸化還元媒介剤を使用することが、例として挙げられる。その他の例について、以下に説明する。

【 0 2 5 3 】

クーロメトリーによる測定に関して述べたように、バックグラウンド信号が、分析物の電気分解の際に発生する信号の大きさの 5 倍を上回らないようセンサーを設計し、作動させることが好ましい。バックグラウンド信号は、分析物の電気分解によって発生する信号の 200%、100%、50%、25%、10%、または 5% を上回らないことが好ましい。バックグラウンド信号と比較する分析物量に関しては、「バックグラウンド信号」と題するセクションで既に述べた。アンペロメトリーの場合、分析物量の電気分解により発生する信号は、測定が行われる時点での電流に相当する。ボテンシオメトリーの場合、分析物量の電気分解により発生する信号は、測定が行われる時点での電位に相当する。

【 0 2 5 4 】

例えば、温度、セルジオメトリー、および電極サイズのような所定の作動条件下において、バックグラウンド電流の大きさ I_{back} は、下記の式により求められる。

$$I_{back} = K C_x D_x / d$$

式中、K は比例定数、 C_x は測定域における媒介剤濃度、 D_x (D_x) は通常の作動条件下における測定域内の媒介剤の有効拡散係数、d は電極間の距離である。

【 0 2 5 5 】

クーロメトリー以外によるアッセイに関し、バックグラウンド電流を低減することが望ましい。先に述べたセンサー構成および方法が一般に有用であり、例えば、分析物濃度よりも低い濃度の酸化還元媒介剤および／または第 2 の電子移動剤（例えば、酵素）を用いること、および／または比較的低い有効拡散係数を有

する大きな酸化還元媒介剤を使用することが含まれる。上述したその他の有用な方法には、例えば、拡散性媒介剤の流れに対するバリヤ（例えば、荷電または極性バリヤ）を設けるか、または、比較的低い有効拡散係数を有する酸化還元媒介剤を使用することによって、酸化還元媒介剤の拡散を低減する方法が含まれる。

【0256】

いくつかの例においては、有効拡散係数は、約 $1 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{秒}$ 以下、約 $1 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{秒}$ 以下、または約 $1 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{秒}$ 以下である。さらに、場合によっては、 $C_x D_x$ の積（酸化還元媒介剤濃度 × 有効拡散係数）は、約 $1 \times 10^{-12} \text{ モル}/\text{cm} \cdot \text{秒}$ 以下、約 $1 \times 10^{-13} \text{ モル}/\text{cm} \cdot \text{秒}$ 以下、または約 $1 \times 10^{-14} \text{ モル}/\text{cm} \cdot \text{秒}$ 以下である。

【0257】

アンペロメトリーによるグルコース測定の具体例を以下に示す。グルコース測定は、 $d = 0.01 \text{ cm}$ の距離で離間した対向する電極を備えた 1 マイクロリットルのセルに対して 60 秒間行われ、この間に 10% のグルコースが電気分解される。グルコース濃度 $C_6 = 5 \text{ mM}$ （すなわち、 $5 \times 10^{-6} \text{ モル}/\text{cm}^3$ ）、面積 $A = 0.1 \text{ cm}^2$ 、酸化還元媒介剤による電荷数 $n_x = 1$ 、およびグルコースによる電荷数 $n_6 = 2$ の条件で測定が行なわれた場合、酸化還元媒介剤およびグルコースにより生じるバックグラウンド電流は、以下のように求められる。

$$\begin{aligned}
 i_{\text{back}} &= A F n_x D_x C_x / d \\
 &= (0.1) (96,500) (1) D_x C_x / (0.01) \\
 &= 9.65 \times 10^5 C_x D_x \\
 i_6 &= n_6 A d (0.1) F C_6 / t \\
 &= (2) (0.01) (0.1) (96,500) (5 \times 10^{-6}) / 60 \\
 &= 1.61 \mu \text{アンペア}
 \end{aligned}$$

【0258】

したがって、 $i_{\text{back}} / i_6 = 5$ の場合、 $C_x D_x$ の値は $8.34 \times 10^{-12} \text{ モル}/\text{cm}^2 \cdot \text{秒}$ である。他の例としては、 $i_{\text{back}} / i_6 = 0.5$ の場合、 $C_x D_x$ の値は $8.34 \times 10^{-13} \text{ モル}/\text{cm}^2 \cdot \text{秒}$ である。さらに、 $i_{\text{back}} / i_6 = 0.05$ の場合、 $C_x D_x$ の値は $8.34 \times 10^{-14} \text{ モル}/\text{cm}^2 \cdot \text{秒}$ である。

【 0 2 5 9 】

アンペロメトリーまたはポテンシオメトリーを用いたいくつかの実施形態においては、酸化還元媒介剤の循環は、作用電極と対電極または対／参照電極とを、測定期間中における酸化還元媒介剤の拡散距離が電極間の距離を上回らないような距離で離間することにより低減される。酸化還元媒介剤は、電極間における酸化還元媒介剤の有効拡散係数を D_e 、時間を t とした場合、 $(D_e t)^{1/2}$ に相当する距離だけ拡散する。有効拡散係数が $10^{-5} \sim 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{秒}$ の酸化還元媒介剤を用いて 30 秒間の測定を行う場合、少なくとも $100 \mu\text{m}$ 、好ましくは少なくとも $200 \mu\text{m}$ 、より好ましくは少なくとも $400 \mu\text{m}$ の距離で電極を離間すべきである。

【 0 2 6 0 】

作用電極および対電極を離間する一方法は、より厚いスペーサーを電極間に使用することである。これに代わる一方法が、図 27 に説明されている。この実施形態においては、作用電極 740 が第 1 基板 742 上に配置され、対電極 744 が第 2 基板 746 上に配置されている（あるいは、これら電極を同一基板上に配置してもよい）。作用電極 742 および対電極 744 は、2 つの電極間の有効距離 d が、スペーサー層 748 の厚さ w より大きくなるよう、ずらして配置されている。一実施形態においては、電極間の距離 d が、 $25 \sim 1000 \mu\text{m}$ 、 $50 \sim 500 \mu\text{m}$ 、または $100 \sim 250 \mu\text{m}$ の範囲になるように選択される。

【 0 2 6 1 】

これに加えて、またはこれに代わるものとして、定常状態のアンペロメトリーおよびポテンシオメトリーの場合、バックグラウンド信号は、電気分解速度を、例えば、30 秒、1 分、5 分、または 10 分の測定期間中に、分析物濃度が約 20 %、10 %、または 5 % 以下を超える範囲で低減するのを防止する程度のゆるやかな速度にすることによって制御できる。いくつかの例においては、電気分解速度を制御するため、第 2 の電子移動剤の濃度もしくは活性度を低減してもよく、および／または作用電極の面積を低減してもよい。

【 0 2 6 2 】

例えば、第 2 の電子移動剤を酵素とすることができますが、酵素活性度は電気分

解速度に対する制限要因となりうる。例えば、分析物濃度が 5 mM グルコース（すなわち、1 μ L当たり 5×10^{-9} モルのグルコース）で、10%以下のグルコース (5×10^{-10} モル) が 3.0 秒の測定期間中に電気酸化される場合には、1 μ L当たりの電流値は $3 \cdot 3 \times 10^{-10}$ アンペアを超えるべきではない。一単位 (one unit) の酵素とは、pH 7.4 の 37°C の HEPES 緩衝液中における 1 μ モルの基質の電気分解を 60 秒間で触媒する量の酵素を指す。よって、グルコースに関しては、1 cm^3 (すなわち、1 mL) 当たり $3 \cdot 3 \times 10^{-3}$ アンペアまでの電流を発生させることができる。したがって、酵素量の制御により電気分解量を制御するセンサーに使用される酵素の最大量は、1 単位/ cm^3 以下とすべきである。

【0263】

電気分解速度は、比較的小さい作用電極面積を用いることによっても制限することができる。作用電極面積が十分に小さい（例えば、約 0.01 cm^2 以下、約 0.0025 cm^2 以下、または約 0.001 cm^2 以下）場合、電極へ向かう分析物の径方向拡散は、定付加電位 (constant applied potential) で、分析物濃度を表す定常状態電流によって起こる。円形の電極に関しては、適切な表面積は、半径 60 μm 以下、30 μm 以下、または 20 μm 以下の電極を用いることにより達成できる。分析物の径方向拡散とは、電極表面に対する垂直方向だけでなく、あらゆる方向からの分析物の輸送を含むものであり、ゆえに電極表面近傍の分析物の消耗を低減または防止できる。平面上に存在する小型の電極は、径方向拡散を可能にする。表面積の大きい電極を有するセンサーでは、分析物の電極への移動は、電極表面に対する垂直方向からの拡散が優位となる。この結果、輸送速度を落としても、電極表面近傍での分析物消耗を克服することは一般に不可能であり、また、一定付加電位では、電流は時間 t の経過と共に、 $t^{-1/2}$ だけ減少する。

【0264】

ヤーニツキーおよびヘラーによるジェイ フィズ ケム、102:10057
～61 (1998年) (Yarnitzky and Heller, J. Phys. Chem., 102:10057

ー 61 (1998) に提案されている、電位が分析物濃度に対して直線的に変化するタイプのポテンシオメトリーによるアッセイに関しては、分析物濃度および／または特定の酸化状態にある酸化還元媒介剤は、アッセイの間、約 20 % 以下の範囲で変化すべきである。20 % を超える範囲で濃度変化が起こる場合、分析物または酸化還元媒介剤の拡散は、例えば、温度および／または試料室および／または測定域の体積を制御することによって制御すべきである。

【 0 2 6 5 】

この記載により分析物の電気分解を説明したが、当業者であれば、同様の装置および方法が、例えば、コットレル型反応における媒介剤の平均的な酸化状態の測定にも適していることを認識するであろう。

【 0 2 6 6 】

(空気酸化可能な酸化還元媒介剤)

酸化還元媒介剤を有するセンサーにおいて、測定誤差の潜在的な原因は、未知の混成した酸化状態にある酸化還元媒介剤（すなわち、既知の酸化状態に再現されない媒介剤）の存在である。酸化還元媒介剤が作用電極で電気酸化または電気還元された時に通過する電荷は、初期の酸化状態に影響される。上述の「センサーの操作」と題するセクションに記載した式 (1) および (2) を参照すると、生化学物質 B の酸化に起因しない電流が、試料添加前に還元形である酸化還元媒介剤 A の部分の酸化に起因して流れる。したがって、センサーへの試料導入前ににおける分析物の酸化状態を知ることは重要である。さらに、酸化還元媒介剤の全部またはほぼ全部が、センサーへの試料導入前に同一の酸化状態または酸化程度で存在することが望ましい。

【 0 2 6 7 】

各酸化還元媒介剤は、還元形または還元状態と、酸化形または酸化状態とを有している。測定される電流に影響を及ぼす著しいバックグラウンド信号を避けるため、試料導入前に還元形である酸化還元媒介剤の量は、試料中の分析物の予測量よりもはるかに少ないことが好ましい。本発明の本実施形態においては、試料導入前において還元形である酸化還元媒介剤のモル量は、予測分析物濃度における分析物のモル量に対し、化学量論的に、好ましくは約 10 % 以下、より好まし

くは約5%以下、最も好ましくは1%以下である（分析物および酸化還元媒介剤の相対的なモル量は、適用される酸化還元反応の化学量論に基づいて比較される。例えば、分析物1モルの電気分解に2モルの酸化還元媒介剤が必要である場合、分析物導入前に還元形である酸化還元媒介剤のモル量は、予測される分析物の濃度における分析物のモル量の、好ましくは20%以下、より好ましくは約10%以下、最も好ましくは約2%以下である）。還元媒介剤の量を制御する方法については、後で述べる。

【0268】

本発明の別の態様においては、センサーへの試料導入前における、還元された酸化還元媒介剤に対する酸化された酸化還元媒介剤の比率が、同様に構成されたセンサー間で比較的一定であることが好ましい。この比率を比較的一定に保たないと、同様に構成された複数のセンサーで同一の試料に関して得た結果における分散（scatter）が増加する。本発明のこの態様に関しては、センサーへの試料の導入前に還元形である酸化還元媒介剤の割合は、同様に構成されたセンサー間で、約20%以下、好ましくは約10%以下の範囲で変化する。

【0269】

センサーへの試料導入前における還元酸化還元媒介剤の量を制御する一方法は、媒介剤の還元体を酸化する酸化剤を供給することである。最も利便性のよい酸化剤の一つとして、O₂が挙げられる。酸素は、通常、この酸化作用の実行に即座に使用できる。酸素は、センサーを空気に曝すことより供給できる。その上、ポリマーおよび液体のほとんどが、特別な予防措置を採らない限り、空気からO₂を吸収する。一般に、空気酸化可能な（すなわち、O₂により酸化可能な）固体の媒介剤の少なくとも90%が、例えば1ヶ月以下、好ましくは1週間以下、より好ましくは1日以下の有用期間に渡って保存または空気に曝すことによって、酸化状態となる。センサーへの配置前に、媒介剤を固体または溶液のいずれかの状態で空気酸化するのに十分な期間保存すると、空気酸化が起こる。空気酸化可能な酸化還元媒介剤が溶液中に存在する場合、酸化還元媒介剤の少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%の酸化を達成するのに要する時間は、アッセイの予想継続時間の少なくとも10倍、かつ溶液の可使寿命未満であることが好ま

しい。好ましくは、酸化還元媒介剤の少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%が一週間未満、好ましくは1日未満、より好ましくは8時間未満、さらに好ましくは1時間未満で空気酸化されることが好ましい。

【0270】

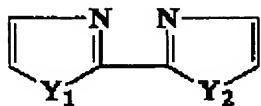
単一のバッチにて製造されたセンサーの媒介剤は、同一の酸化状態または酸化程度にすることが望ましいが、媒介剤を完全に参加し、より高い原子価状態にすることは必要ではない。さらに、溶解した酸化還元媒介剤の空気酸化は、アッセイ期間中の空気酸化が測定値に干渉したり、または測定値誤差を誘発しない程度の速さであることが望ましい。

【0271】

空気酸化可能（すなわち、○：酸化可能）で、かつ電子移動能を有する好適な媒介剤については既に述べた。有用な媒介剤の特定の一系統は、（電子豊富な（electron-rich）含窒素複素環または電子豊富な含窒素複素環とハロゲン化物との結合体に結合したオスミウム錯体である。電子豊富な含窒素複素環としては、アルキル基、アルコキシ基、アミノ基、アルキルアミノ基、アミド基、およびメルカブト基のような電子供与置換基を含有するイミダゾール誘導体およびビリジンまたはフェナントロリンの誘導体が挙げられる。ただし、含電子過剰窒素複素環は、これらに限定されない。オスミウム錯体は、酸化還元媒介剤が全体的に正に荷電して水溶性となるように、金属に配位したハロゲン化物を1以下有していることが好ましい。一例として、モノー、ジー、およびポリアルコキシ-2, 2'-ビビリジンと錯化したオスミウムが挙げられる。他の例としては、水への溶解度を維持するのに十分な炭素と酸素の比率を有する、空気酸化可能なアルコキシ基を備えたモノー、ジー、およびポリアルコキシ-1, 10-フェナントロリンが挙げられる。これらのオスミウム錯体は、一般に、置換ビリジンまたは置換フェナントロリンリガンドを2個有している。ただし、2個のリガンドは同種である必要はない。これらのオスミウム錯体は、ビリジンおよびイミダゾールのような含窒素複素環を1以上有するモノマーリガンドまたはポリマーリガンドとさらに錯化している。好ましいポリマーリガンドとしては、ポリ（4-ビニルビリジン）、さらに好ましくはポリ（1-ビニルイミダゾール）、またはそれらの

共重合体が挙げられる。ポリ(1-ビニルイミダゾール)またはポリ(4-ビニルビリジン)と錯化した [O_s 4, 4'-ジメトキシ-2, 2'-ビビリジン] : C_1^{++} は、 O_s^{++} 陽イオンが O_2 によって O_s^{++} へと酸化されるため、特に有用であることがわかっている。同様の結果が、 [O_s (4, 7-ジメトキシ-1, 10-フェナントロリン) : C_1] $^{++}$ 、ならびに他のモノマー、ジマー、およびポリアルコキシビリジンおよびフェナントロリンの、同種のポリマーとの錯体についても期待できる。臭素のような他のハロゲン基で、塩素を置換してもよい。同様の結果が、上記により特定した、下記の構造を含む他の錯体についても期待できる。

【化9】



【0272】

酸化還元媒介剤の空気酸化が急速に起こり、分析物によって還元された酸化還元媒介剤の大部分が分析物アッセイ中に O_2 により酸化される場合、空気酸化可能な媒介剤に関連する複雑な問題が生じる。この場合、媒介剤は電極で電気酸化されるより、むしろ空気によって酸化されるため、分析物の量が少なく見積られ、アッセイが不正確となる。媒介剤の空気酸化が急速に起こると、溶解空気および空気の不拡散 (in-diffusion) が測定結果に影響を及ぼすため、酸化還元媒介剤の O_2 との反応は、媒介剤の電気酸化よりもゆっくりと進行することが好ましい。

【0273】

一般に、アッセイは 10 分以内、好ましくは 5 分以内、最も好ましくは 1 分以内で行なわれるため、媒介剤は、保存時に空気酸化可能であっても、アッセイ期間中に溶解酸素によって酸化されることはない。したがって、血漿または血清中に溶解した場合に、1 分間、好ましくは 10 分間でも空気酸化しない媒介剤が好ましい。一般に、還元媒介剤の 5 % 以下、好ましくは 1 % 以下が、アッセイ中に

空気によって酸化されるべきである。

【 0 2 7 4 】

媒介剤の空気酸化の反応速度は、適切な錯化ポリマーを選択することによって制御できる。例えば、ポリ(1-ビニルイミダゾール)と配位結合した $[\text{O}_s(4,4'-ジメトキシ-2,2'-ビピリジン), \text{C}_1]^{++}$ に対する酸化反応は、ポリ(4-ビニルピリジン)と配位結合した同種の O_s 錯体よりもずっと速く進行する。適切なポリマーは、予測される分析物濃度ならびに電極間に印加される電位次第で選択されるが、これらはいずれも電気化学反応の速度を決定するものである。

【 0 2 7 5 】

よって、本発明の一実施形態においては、好ましい酸化還元媒介剤は以下の特性を有する。1) 媒介剤は、試料中またはセンサー内に存在する、分析物以外のいかなる分子とも(任意に、第2の電子移動剤を介して)反応しない。2) 酸化還元媒介剤のほぼ全てが、センサーへの試料導入前に O_2 等の酸化剤で酸化される。3) 酸化剤による酸化還元媒介剤の酸化は、電極による媒介剤の電気酸化に比べて遅い。

【 0 2 7 6 】

あるいは、酸化還元媒介剤が分析物の存在下で酸化され、電極で電気還元される場合は、酸化剤よりもむしろ還元剤が必要となる。還元剤および媒介剤の適切な選択についても、酸化剤について上述したのと同様の考察を適用する。

【 0 2 7 7 】

空気酸化可能な安定な酸化還元媒介剤を本発明の電気化学センサーに使用すれば、保存および包装時においてさらなる利点が提供される。空気酸化可能な酸化還元媒介剤を備えた本発明のセンサーは、酸素分子を含有する雰囲気中で包装でき、酸化還元種の少なくとも 80% 以上、好ましくは少なくとも 90% 以上を酸化状態に維持しながら、例えば 1 ヶ月を超える長期間保存することができる。

【 0 2 7 8 】

(光学センサーにおける空気酸化可能な媒介剤の使用)

本発明の空気酸化可能な酸化還元種は、他のタイプのセンサーにも使用するこ

とができる。上述のオスミウム錯体は、錯化した $O\ s^{+2}$ 種および $O\ s^{+3}$ 種の吸収スペクトル、発光、および／または蛍光特性が相違しているため、光学センサーでの使用に適している。酸化還元種の吸収、透過、反射、発光および／または蛍光の測定値は、（分析物と酸化還元種との間における直接的または酵素などの第2の電子移動剤を介した反応後の）試料中の分析物量と相関している。この構成においては、酸化還元媒介剤のモル量は、化学量論的に、センサーの測定域を満たすと適切に予測される分析物のモル量よりも大きくすべきである。

【 0 2 7 9 】

光導型光学ファイバーセンサーを含む標準的な光学センサー、および標準的な光学的測定方法は、空気酸化可能な媒介剤との使用に適応させることができる。例えば、本発明の光学センサーは、空気酸化可能な酸化還元種と、好ましくは、分析物応答性酵素とによって被覆されて膜が形成された、光透過性または光反射性の支持体を備えていてもよい。支持体の膜は、試料を配置する測定域の境界の一つを形成する。測定域の他の境界は、セルの構成によって決まる。分析物を含有する試料で測定域を満たすと、分析物による、好ましくは分析物に応答し得る酵素との反応を介した、空気酸化可能な媒介剤の還元が媒介剤の酸化状態の変化を引き起こすが、これは光の透過、吸収、もしくは反射スペクトルにおける変化、または媒介剤の1以上の光波長での発光および／または蛍光における変化によって検出される。

【 0 2 8 0 】

（多電極センサーならびに校正）

種々の理由により、多電極センサーを使用することができる。例えば、単一の試料を用いて種々の分析物を分析するために多電極センサーを使用してもよい。図5に示す多電極センサーの一実施形態は、1以上の作用電極22を備えた1以上の試料室を有し、各作用電極22が異なる測定域を定めている。酸化還元媒介剤が非浸出性である場合、作用電極の1以上が、第1の分析物のテストに適切な試薬（chemical reagents）、例えば、適切な酵素を備えており、残りの作用電極の1以上が、第2の分析物の検査に適切な試薬を備えている。試薬（例えば、酸化還元媒介剤および／または第2の電子移動剤）は、感知層として作用電極上

に堆積させることができ、拡散性の試薬を用いる場合には、試薬を試料室のいずれかの面に配置するか、または試料中に配することが可能である。例えば、多電極センサーは、1) 感知層にグルコースオキシダーゼを備えた、グルコース濃度測定用の1以上の作用電極と、2) 感知層に乳酸オキシダーゼを備えた、ラクテート濃度測定用の1以上の作用電極とを含んでいてもよい。

【 0 2 8 1 】

多電極センサーは、結果として得られる読み (readings) の精度を改善するために使用することもできる。各作用電極 (全ての作用電極、または同一の分析物を検出する作用電極) から得た測定値を平均し、より正確な読みを得ることができる。場合によっては、測定値と平均値との差が限界値を超えるなら、その測定値を除外してもよい。この限界値は、例えば、平均測定値の標準偏差のような統計学的なパラメータに基づいて決定することができる。除外値を省略した上で、再度平均値を算出してもよい。さらに、特定の電極に欠陥があると推測される場合、除外値が得られた電極からのその後の読みを、その後のテストにおいて無視してもよい。あるいは、所定数の読みを他の電極からの読みに基づいて除外した後に、特定の電極を除外してもよい。

【 0 2 8 2 】

多電極センサーの使用により精度を向上させることに加え、各電極において測定を複数回行い、それらを平均して精度を向上させることができる。単電極センサーにおいても、この方法を用いて精度を向上させることができる。

【 0 2 8 3 】

大量生産されたセンサーを使用する場合、センサー環における測定域の体積のばらつきにより、アッセイにおいて誤差が発生する。測定域の3寸法のうちの2つである長さと幅は、通常は比較的大きく、約1～5mmである。このような寸法の電極は、2%以下の不和 (variance) で容易に作製できる。しかしながら、1μm未満の測定域体積においては、第3の寸法が、長さまたは幅よりも1または2桁小さいことが必要となる。上述のように、試料室の厚みは、一般に、約50～200μmの範囲である。厚みに関する製造上の不和は、50～200μm程度である。したがって、測定域内の試料体積におけるこの不確定性に適応でき

る方法を提供することが望ましい。

【 0 2 8 4 】

図 5 に示す本発明の一実施形態においては、複数の作用電極 42、44、46 が、基材 48 に設けられている。これらの電極は、図示していない複数の対電極が配置された、図示していない別の基体に覆われ、複数の対向電極対を提供している。所定のセンサーにおける電極対間での作用電極と対電極との離間距離の不和は、作用電極および対電極が、各電極対間に同一のスペーサー 28 を有して单一の基体上にそれぞれ設けられているため、著しく減少する（図 3 参照）。

【 0 2 8 5 】

電極対の測定域の体積を正確に測定するのに使用でき、ノイズの低減にも有用な多電極センサーの一例をここに示す。この例においては、1 つの作用電極 42 が、非浸出性酸化還元媒介剤および非浸出性の第 2 の電子移動剤（例えば、酵素）を備えている。作用電極 42 とそれに対応する対電極との間に吸収材を配置してもよい。別の作用電極 44 は、電極上に、非浸出性酸化還元媒介剤を備えているが、第 2 の電子移動剤は備えていない。ここでも、この第 2 電極対は、作用電極 44 とそれに対応する対電極との間に吸収材を備えていてもよい。任意に設けられる第 3 の作用電極 46 は、電極に結合した酸化還元媒介剤および第 2 の電子移動剤を備えておらず、作用電極 46 とそれに対応する対電極との間に吸収材も存在していない。同様の形態が、拡散性の酸化還元媒介剤および／または拡散性の第 2 の電子移動剤を使用しても構成できる。ただし、拡散性成分は作用電極に配置されるとは限定されない。いくつかの例においては、電極対間に十分な距離が存在し、酸化還元媒介剤および／または酵素が測定期間内および／または試料室への同一の試料導入時から測定終了時までに電極対間を実質的に拡散しない。

【 0 2 8 6 】

試料導入前に不均一な酸化状態で存在する酸化還元媒介剤に起因するセンサーの誤差は、電極 42 および 44 に近接する各測定域において、同時に試料を電気分解することによって測定できる。電極 44 においては、第 2 の電子移動剤が存在しないため、（第 2 の電子移動剤が必要であると仮定すると）分析物は電気分解されない。しかしながら、試料導入前に混成した酸化状態（すなわち、酸化還

元中心のいくつかは還元形、いくつかは酸化形) にある酸化還元媒介剤の電気分解および/または作用電極と対電極の間における拡散性酸化還元媒介剤の往復に起因して、電荷が移動する(そして、電流が流れる)。この第2の電極対において電極間を通過する小さい電荷を、第1の電極対間を通過する電荷から差し引いて、酸化還元媒介剤の酸化状態に起因した誤差を実質的に除去することおよび/または拡散性酸化還元媒介剤に起因するバックグラウンド電流を除去することができる。この処理により、容量性の充電および誘導性の電流に関連する誤差はもちろん、アスコルビン酸塩、尿酸塩、およびアセトアミノフェンのような電気分解される他の妨害物質に関連する誤差までもが低減される。

【 0 2 8 7 】

試料室の厚みは、電極46(または、吸収材が存在しない電極42、44のいずれか)とそれに対応する対電極との間の静電容量を、好ましくはいかなる液体も存在しない時に、測定することによって求められる。電極対の静電容量は、電極の表面積、電極間の間隔、および平板間に存在する物質の誘電率に左右される。空気の誘電率は不变であるため、一般に、この電極形態の静電容量は数ピコファラードである(または、電極と対電極との間に液体が存在する場合は、ほとんどの生体液の誘電率が約75であるという前提で、約100~1000ピコファラードである)。よって、電極の表面積は既知であるため、電極対の静電容量を測定することにより、測定域の厚みを約1~5%の範囲内で測定することができる。

【 0 2 8 8 】

吸収材の空孔体積の量は、電極44(第2の電子移動剤を備えていない)とそれに関連する対電極との間の、液体の添加前後における静電容量を測定することによって求められる。液体は大きい誘電率を有するため、前記液体を添加すると静電容量は著しく増加する。液体の存在時および不存在時の静電容量を測定することにより、電極間の間隔および吸収材中の空孔体積を求めることができ、ゆえに反応領域における液体の体積を求めることができる。

【 0 2 8 9 】

別の電極形態においても、これらの方法(すなわち、確定成分(critical component)の不存在下における静電容量の測定およびクロメトリーによる測定)

を使用して、測定する試料体積に関する不正確な知識および妨害物質に起因するバックグラウンドノイズおよび誤差を低減することができる。1以上の電極対および前述した1以上の測定値を含むプロトコルを展開することができ、それは本発明の範囲内である。例えば、静電容量測定に要する電極対は1つだけであるが、便宜的に追加の電極対を使用してもよい。

【0290】

(充填指示器)

1 μ L以下の液体を充填した試料室を用いる場合、試料室の充填がいつ完了したのかを確認できることが望ましい場合がしばしばである。図18A～18Cは、充填指示器構造を備えたセンサーの一例を示すものである。図18Aは、作用電極502が印刷された第1基板500を示している。例えば、粘着性物質の層または両面粘着テープといったスペーサー504(図18B)が第1基板500と作用電極502の上方に形成され、層内に形成された溝506により試料室が提供される。図18C(電極側を上にするため、図18Aおよび18Bに対する表裏反転図)に示すように、第2基板508には2つの対電極510、512が印刷されている。いくつかの例においては、溝506の入口514に最も近い対電極510は、もう一方の対電極512の少なくとも2倍、好ましくは少なくとも5倍または10倍の表面積を試料室内に有する。

【0291】

センサーが液体で満たされると、第2の対電極512と作用電極502との間の信号を観察することによって、センサーは充填済みを知らせることができる。液体が第2対電極512に達すると、その対電極からの信号が変化するはずである。観察に適した信号としては、例えば、第2の対電極と作用電極502との間における電圧、電流、抵抗、インピーダンス、または静電容量が挙げられる。あるいは、充填後にセンサーを観察し、信号(例えば、電圧、電流、抵抗、インピーダンス、または第2静電容量)の値が、試料室の充填が完了したことを示す値に達したかどうかを確認してもよい。

【0292】

これに代わる実施形態においては、対電極および/または作用電極を2以上の

パーツに分け、各パーツからの信号を観察してセンサーの充填が完了したことを確認してもよい。一例においては、作用電極は、対電極および指示電極と対向する。別の例においては、対電極、作用電極、および指示電極は対向しておらず、例えば、横並びに配置されていてもよい。その他の場合、第2の電極対を用い、この第2の電極対からの信号を監視し、信号の変化および／または信号が特定の値に近づいたことによってセンサーが充填されたことをかくにんしてもよい。一般に、指示電極は、作用電極および対電極に比べ、試料導入口に対し、より下流側に位置している。

【 0 2 9 3 】

図 19 A～19 C および 20 A～20 C に示しているセンサーのような側面充填式センサーに関しては、2つの指示電極を主要対電極のいずれかの側に配置してもよい。これにより、指示電極をより上流側に配置した状態で、使用者が左右いずれの側からも試料室を充填することが可能になる。側面充填式センサーはまた、単一の指示電極、および、好ましくは、いずれの側を試料液と接触させるべきか示す表示をさらに備えていてもよい。

【 0 2 9 4 】

一実施形態においては、試料室が中途半端に充填されるのを防止するため、3つの対／参照電極および／または指示電極を用い、試料室の充填開始時および充填完了時を検出する。本実施形態においては、2つの指示電極を、最大の対／参照電極とは相違する電位に保っている。試料室の充填の開始および完了は、指示電極と対／参照電極との間における電流の流れによって表示される。

【 0 2 9 5 】

別の例においては、各対／参照電極の電位は同等であってよい。3つの対／参照電極全ての電位が同等、例えば 0 V である場合、測定域の充填が開始されると、その液体によって作用電極と第1の対／参照電極とが電気的に接触し、分析物が酵素および媒介剤と反応することによって、第1の対／参照電極間に電流が流れる。液体が第3の対／参照電極に達すると、第1の対／参照電極の場合と同様に、測定域が満たされたことを示す別の電流が測定できる。測定域の充填が完了すれば、3つの対／参照電極を短絡させてもよく、またはこれらの信号を加算し

たり、その他の方法で組み合わせててもよい。

【 0 2 9 6 】

指示電極は、多電極センサーに関して上述の方法により、分析物測定の精度を改善するために使用してもよい。指示電極は、作用電極として、または対電極もしくは対／参照電極として作動してもよい。図18A～18Cに示した実施形態においては、指示電極512は、作用電極502に対し、第2の対電極または対／参照電極としての機能を果たす。より正確な測定値を得るために、指示電極と作用電極の対から得た測定値を、第1の対電極または対／参照電極と作用電極の対より得た測定値とを組み合せる（例えば、加算および／または平均化）ことができる。一実施形態においては、指示電極は、対電極または対／参照電極と共に、第2の作用電極として作動してもよい。別の実施形態においては、指示電極は、第2の対電極または対／参照電極と共に、第2の作用電極として作動してもよい。さらに別の実施形態においては、指示電極は、第2の作用電極と共に第2の対電極または対／参照電極として作動してもよい。

【 0 2 9 7 】

センサーまたはセンサー読取装置は、測定域の充填が完了したこと使用者に知らせるため、指示電極に反応してアクティブ化するサイン（例えば、視覚的サインまたは聴覚的信号）を備えていてもよい。いくつかの例においては、センサーまたはセンサーリーダーは、指示電極が、使用者への告知あり、または告知無しに、測定域の充填が完了したことを示してから読み取りを開始するように構成されていてもよい。読み取りは、例えば、作用電極と対電極との間への電位の印加と作用電極で発生した信号の監視の開始によって始まる。

【 0 2 9 8 】

（試料の加熱）

試料を加熱し、分析物の拡散、酸化、または還元の速度を速めることができる。この加熱は、加熱環境下へのセンサーの配置またはセンサーへの発熱体の適用を含む種々の方法により達成できる。

【 0 2 9 9 】

他の方法としては、例えば、電気エネルギーを熱エネルギーに変換し得るワイ

ヤーまたはインクといった熱的加熱エレメントをセンサーに設けることが挙げられる。このワイヤーまたはインクは、ポリマーフィルムのような基材において、例えば、1以上の作用電極、対電極、参照電極、または対／参照電極と反対側に、あるいは作用電極、対電極、参照電極、または対／参照電極の周囲に適用することができる。いくつかの例においては、試料の温度が、初期温度から5～20℃の範囲で上昇するように加熱することができる。別の例においては、試料の温度は既知でなくてもよいが、ワイヤーまたはインクに一定量の電力または電流を印加するようとする。

【0300】

【実施例】

本発明を、以下の実施例によりさらに特徴付けられる。これらの実施例は、これまでの記述により十分に説明された本発明の範囲を限定することを意図するものではない。本発明の概念の範囲内の変更は、当業者には明らかである。

【0301】

(実施例1)

[グルコース濃度測定用の小体積生体外センサーの作製]

図1に示した発明の実施形態に対応させてセンサーを構成した。作用電極をマイラーフィルム（商標：デュポン社）上に形成した。マイラーフィルムは、厚さが0.175mm、直径が2.5cmであった。約1cmの直径を有する厚さ約12ミクロンのカーボンパッドを、マイラーフィルム上にスクリーン印刷した。厚さが12μmで、中央に直径4mmの開口部を有する水不溶性の誘電性絶縁体（インスレイヤー（Insulayer））で、炭素電極を被覆した。

【0302】

誘電体で被覆されていない炭素電極の中心部を、非浸出性の酸化還元媒介剤で被覆した。酸化還元媒介剤は、タイラー等、ジャーナルオブエレクトロアナリティカルケミストリー、396:511(1995年)（Taylor et al., J. Electroanal. Chem., 396:511 (1995)）に記載されているように、ポリ(1-ビニルイミダゾール)をOs(4,4'-ジメトキシ-2,2'-ビビリジン):Cl₂と錯化させ、次に、ポリエチレングリコールジグリシジルエーテル(PEGDGE)

) を用いてグルコースオキシダーゼを、オスミウムポリマーと架橋して生成した。酸化還元媒介剤におけるオスミウムとイミダゾール官能基の比率は、約 1 : 1.5 であった。媒介剤を、厚さ 0.6 μm 、直径 4 mm の層状の作用電極上に配置した。電極上における媒介剤の被覆率は約 60 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (乾燥重量) であった。スペーサーを、電極上の媒介剤で被覆された表面を取り囲むように電極上に配置した。スペーサーは、ポリテトラフルオロエチレン (PTFE) 製であり、厚さは約 0.040 mm であった。

【 0 3 0 3 】

吸収材を、作用電極の媒介剤で被覆された表面に接触させて配置した。吸収材は、ナイロン (Tetko Nitex nylon 3-10/2) 製であった。吸収材は、直径 5 mm、厚さ 0.045 mm、空孔体積が約 20 % であった。測定域内の試料体積を、吸収材と電極の寸法および特性から算出した。測定域は、直径 4 mm (媒介剤で被覆された電極表面の直径)、厚さ 0.045 mm (ナイロン吸収材の厚さ) であり、よって体積は 0.57 μL であった。この空間の約 80 % がナイロンで充填されており、残りの 20 % がナイロン吸収材内の空孔である。この結果、測定域内の試料の体積は、約 0.11 μL であった。

【 0 3 0 4 】

対／参照電極を、スペーサーおよび吸収材の作用電極とは反対側の面と接触させて配置し、2つの電極を互いに対向させた。対／参照電極は、約 1 cm の直径を有する厚さ 12 ミクロンの銀／塩化銀層をスクリーン印刷した、厚さ 0.175 mm、直径約 2.5 cm のマイラーフィルムで構成した。

【 0 3 0 5 】

電極組立品の両側に配した平板を用い、電極、吸収材、およびスペーサーを合わせて加圧した。平板はポリカーボネートプラスチックで形成し、センサーの形状を保つため、しっかりと締め付けられた。電極は、使用前に 48 時間空气中で保存した。

【 0 3 0 6 】

分析装置との電気的な接続に備え、タブが作用電極および対／参照電極の両方から伸びていた。ポテンシオスタットを使用し、作用電極を陰極として、作用電

極と対／参照電極との間に + 200 mV の電位差を加えた。電極間に導電性の経路が存在しないため、予測されたように、試料の不存在下では電極間に電流は流れなかった。

【 0 3 0 7 】

試料室内のナイロン吸収材からの延長部として形成されたナイロン吸収材の小タブを介し、試料を導入した。試料と吸収材タブとが接触すると、液体は吸収材に吸上げられた。試料室が満たされ、試料が電極に接触すると、電極間に電流が流れた。試料中のグルコース分子が作用電極上のグルコースオキシダーゼと接触すると、グルコース分子はグルコノラクトンに電気酸化された。そして、酸化還元媒介剤中のオスミウム酸化還元中心が、グルコースオキシダーゼを再び酸化させた。次に、上記オスミウム中心が、作用電極との反応によって再び酸化された。これにより電流が流れるが、この電流をクローメーター (EG&G Princeton Applied Research Model # 173) によって測定し、同時に積分した。

【 0 3 0 8 】

電気化学反応を、95%を超えるグルコースが電気的に還元されたことを示す定常状態の値に電流が達するまで続けた。一定の間隔をおいた電流測定によって得られた電流曲線を積分し、電気化学反応の間に通過した電荷量を求めた。この電荷を既知のグルコース濃度に対してプロットし、検量線を作成した。

【 0 3 0 9 】

人工脳脊髄液の緩衝液または調整血清 (Baxter-Dade, Monitrol Level I, Miami, FL) 中に既知濃度のグルコースを、3 ~ 20 mM グルコースの範囲で含む溶液の 0.5 μL アリコートを用いて、センサーをテストした。人工脳脊髄液は、次の塩の混合物として調整した: 126 mM の NaCl, 27.5 mM の NaHCO₃, 2.4 mM の KCl, 0.5 mM の KH₂PO₄, 1.1 mM の CaCl₂, 2 H₂O, 0.5 mM の Na₂SO₄。

【 0 3 1 0 】

分析結果を表 1 および図 7 に示す。表 1 において、Q_{ave} は、3 ~ 6 個の同一のテスト用試料において、グルコースの電気分解に使用された平均電荷 (図 7 は各テスト用試料についての電荷を示す) であり、90% 立上り時間 (90% rise t

ime) は、グルコースの 90 % を電気分解するのに要する時間に相当する。データは 10 ~ 20 % のセンサー精度を示し、生理学的に関連する範囲内 (30 μ g / dL ~ 600 μ g / dL) はもちろん、低グルコース濃度に対しても十分なセンサー感度が示された。

【 0 3 1 1 】

【表 1 】

グルコースオキシダーゼを用いたセンサーの結果

	テスト試料数	Q ₉₀ (TC)	90 %立ち上がり時間 (秒)
緩衝液のみ	4	8.8 ± 1.8	12 ± 6
3mM グルコース / 緩衝液	5	17.8 ± 8.5	19 ± 5
6mM グルコース / 緩衝液	4	49.4 ± 4.9	25 ± 8
10mM グルコース / 緩衝液	6	96.1 ± 12.4	36 ± 17
15mM グルコース / 緩衝液	5	206.2 ± 76.7	56 ± 23
20mM グルコース / 緩衝液	4	265.7 ± 41.0	62 ± 17
4.2 mM グルコース / 血清	3	44.2 ± 4.8	44 ± 8
15.8 mM グルコース / 血清	3	218.2 ± 57.5	72 ± 21

【 0 3 1 2 】

グルコース濃度の平均測定値を 1 以上の方程式に当てはめ、検量線を得た。

図 8 に、表 1 のグルコース / 緩衝液のデータに関する検量線を示す。 15.0 mM のグルコースの測定値の一つは、測定値の平均値から標準偏差の 2 倍以上離れていたため、この計算から除外した。高グルコース濃度 (10 ~ 20 mM) は一次方程式に適合した。低グルコース濃度は二次多項式に適合した。

【 0 3 1 3 】

図 9 は、不正確なグルコース濃度測定に基づく誤差結果を求めるために、クラークら、ディアベーツケア、5 卷、622 ~ 627 頁、1987 年 (Clarke et al., Diabetes Care, 5, 622-27, 1987) により開発された誤差格子 (error grid) 上にプロットした表 1 のデータを示している。グラフは、測定したグルコース濃度に対する「正確な」グルコース濃度をプロットしたものである。なお、測

定したグルコース濃度は、図8の検量線を図7の各データ点に用いてグルコース濃度を算出することによって求めたものである。A領域内の点は正確であり、B領域内の点は臨床的に許容可能であり、C、D、およびE領域内の点は次第に不適切となっており、最終的には危険な処置につながるものである。

【0314】

データ点は34個存在した。これらのデータ点のうち、91%がA領域、6%がB領域、3%がC領域に存在した。C領域と測定された読み取り値(reading)は、ただ1つだけであった。この読み取り値は、評価から除外され、図9にも示されていない。このように、読み取り値の97%が、臨床的に許容可能なA領域およびB領域に存在した。

【0315】

Os原子の総数は、全てのOsを還元し、次に試料室ないでグルコースを含有しない緩衝液で電気酸化することによって測定した。その結果、59.6±5.4μCの電荷が測定された。この結果と、表1に示したグルコースを含有しない緩衝液での結果との比較により、Osの20%未満が試料導入前に還元形で存在することが示された。還元状態にあるオスミウムの量の変動性は、存在するオスミウムの総量の5%未満である。

【0316】

(実施例2)

[妨害物質に対するグルコースセンサーの応答]

実施例1で述べたものと同様に構成したセンサーを使用し、妨害物質に対するセンサーの応答を測定した。血中グルコース測定に対する主な電気化学的妨害物質は、アスコルビン酸塩、アセトアミノフェン、および尿酸塩である。これら一般的な妨害物質の正常な生理学的または治療的(アセトアミノフェンの場合)濃度範囲は、以下の通りである。

アスコルビン酸塩：0.034-0.114 mM

アセトアミノフェン：0.066-0.200 mM

尿酸塩(成人男子)：0.27-0.47 mM

ティーツの、テキストブック オブ クリニカル ケミストリー、シー. エー. バ

ティスおよびイー・アール、1994年、2210～2212頁(Textbook of Clinical Chemistry, C. A. Burtis and E. R. Ashwood, eds., W. B. Saunders Co., Philadelphia 1994, pp2210-12)より。

【0317】

グルコースを含有しない妨害物質緩衝溶液を、上記の生理学的または治療的範囲の上限の妨害物質濃度でテストした。各テストで注入される試料体積は、0.5 μ Lであった。+100mVまたは+200mVの電位を電極間に印加した。妨害物質の存在下で記録された平均信号から、緩衝液のみの（すなわち、妨害物質を含有しない）溶液から得られた平均バックグラウンド電流を差し引いて、平均電荷 (Q_{avg}) を算出した。この結果得られた平均電荷を、4 mMおよび10 mMのグルコース濃度に監視表1より得られる信号と比較し、妨害物質に起因する誤差の割合を求めた。

【0318】

【表2】

グルコースセンサーの妨害物質

溶液	E (mV)	n	Q_{avg} (TC)	誤差 @ 4 mM グルコース	誤差 @ 10 mM グルコース
0.114 mM アスコルビン酸塩	100	4	0.4	2%	<1%
0.114 mM アスコルビン酸塩	200	4	-0.6	2%	<1%
0.2 mM アセトアミノフェン	100	4	0.1	<1%	<1%
0.2 mM アセトアミノフェン	200	4	1.0	5%	1%
0.47 mM 尿酸塩	100	4	6.0	30%	7%
0.47 mM 尿酸塩	200	4	18.0	90%	21%

【0319】

これらの結果から、アスコルビン酸塩およびアセトアミノフェンは、特に低電位測定においては、グルコースセンサー形態に対する深刻な妨害物質ではないことがわかる。しかしながら、尿酸塩はかなりの妨害を与えた。この妨害は、0.

3.7 mMの尿酸塩濃度に対するセンサーの応答を、例えばこれらの結果からの外挿によって求めた適切な電荷量を、センサーのグルコース測定値の全てから差し引くなどして校正することによって最小化できる。尿酸塩濃度の0.10 mMの変化（尿酸塩濃度の範囲は成人男性で0.27～0.47 mM）に起因する誤差は、4 mMのグルコースおよび100 mVにおいて約6%である。

【 0 3 2 0 】

（実施例3）

〔グルコースデヒドロゲナーゼを備えたセンサー〕

グルコースオキシダーゼをピロロキノリンキノングルコースデヒドロゲナーゼに代え、実施例1の+200 mVの電位と対照的に+100 mVの電位を印加する以外は、実施例1に記載したのと同様にセンサーを作製し、本実施例において使用した。結果を、下記の表3および図10のグラフに示している。

【 0 3 2 1 】

【表3】

グルコースデヒドロゲナーゼを用いたセンサーの結果

	n	Q _{me} (C)	90%立ち上がり時間 (秒)
緩衝液	4	21.7 ± 5.2	14 ± 9
3mM グルコース/緩衝液	4	96.9 ± 15.0	24 ± 6
6mM グルコース/緩衝液	4	190.6 ± 18.4	26 ± 6
10mM グルコース/緩衝液	4	827.8 ± 69.3	42 ± 9

【 0 3 2 2 】

この結果から、グルコースデヒドロゲナーゼセンサーから得られる電荷は、特に低グルコース濃度において、比較用のグルコースオキシダーゼセンサーよりもさらに大きいことがわかった。4 mMのグルコース濃度に関し、2種類のセンサーで得られた測定値は5ファクター（factor of five）相違していた。さらに、グルコースデヒドロゲナーゼセンサーは低電位で作動するため、妨害反応の影響が低減した。

【0323】

さらに、実施例1の結果とは対照的に、表3の結果は、図10に示すように全てが一次方程式に適合した。単一の線形検量線は、センサー構成および操作を単純化する上で非常に好ましい。

【0324】

また、表2に記載の妨害物質の結果がこのセンサーに適用できると仮定すれば、全ての妨害物質は、電位100mVにおいて、3mMグルコース溶液に対して、7%未満の誤差を誘発すると考えられる。

【0325】

(実施例4)

[液体流中のラクテート濃度の測定]

本実施例のセンサーを、ガラス質炭素電極を備えたフローセル（バイオアナリティカルシステム、インク. #MF-1025（BioAnalytical System, Inc. #MF-1025）を用いて構成した。フローセルの電極を酸化還元媒介剤で被覆し、作用電極を設けた。この場合、酸化還元媒介剤は、ポリ（1-ビニルイミダゾール）とOs（4, 4'-ジメトキシ-2, 2'-ビビリジン）:Cl₂と、イミダゾール官能基15個毎にオスミウム1個の比率で錯化して生成したポリマーであった。乳酸オキシダーゼを、ポリエチレングリコールジグリシルエーテルを介してポリマーと架橋させた。媒介剤は、被覆率500μg/cm²、厚さ5Tm(μm)で電極を被覆した。液流中の付着性を向上させるため、トラックエッチングを施した（track-etched）ポリカーボネート膜（Osmonics-Poretics#10550）で媒介剤を被覆した。そしてこの膜上に、試料室と対応する測定域を定める空隙を含む、厚さ50Tm(μm)の単一のスペーサーガスケット（BioAnalytical Systems, Inc. #MF-1062）を配置した。フローセルの参照電極および補助電極を含むセル台（BioAnalytical Systems, Inc. #MF-1005）に取付け、センサーの組立を完了した。

【0326】

この場合、試料室は、媒介剤で被覆された0.031cm²の表面積を有する電極と接触した厚さ50Tm(μm)（スペーサーガスケットの厚さ）の円筒に

相当する。このセンサーの測定域内の試料体積を算出したところ、約0.16T L (μ L) であった。

【0327】

液体流の流速は5T L (μ L) /分であった。標準三電極ポテンシオスタットをセルのリードに取付け、酸化還元媒介剤で被覆されたガラス質炭素電極と参照電極との間に、+200mVの電位を印加した。これは、酵素を介するラクテートの酸化を引き起こすのに十分な電位である。

【0328】

液体流がセンサーを流れている間、ラクテート濃度に比例した定常状態電流が測定された。周期的な間隔で液体流を停止させ、測定域内のほぼ全てのラクテートが電気酸化するまで、すなわち安定した定常状態の電流が得られるようになるまで、電極間に電流を流した。流れを停止させてから電流が定常状態に達するまでに記録される示差的電流 (differential current) を積分し、ラクテートの電気酸化に要する総電荷Qを求めた。そして、濃度を下記の式により算出した。

$$[\text{ラクテート}] = Q / 2 F V \quad (4)$$

式中、Vは測定域内の試料の体積であり、Fはファラデー定数である。

このアッセイは、公称ラクテート濃度が1.0、5.0、および10.0mMであるラクテート溶液を用いて行った。アッセイで測定された濃度は、それぞれ1.9、5.4、および8.9mMであった。

【0329】

(実施例5)

[ポリ(1-ビニルイミダゾール)と錯化したOs(4,4'-ジメトキシ-2,2'-ビビリジン):C₁⁺⁺⁺の酸化状態の測定]

三電極設計のセンサーを、エコセンサーズ リミテッド、ロングハンボロー、イギリス (Ecosensor Ltd., Long Hanborough, England) より、「大面積使い捨て電極 (large area disposable electrode)」のモデル名で商業的に入手した。センサーは、同一平面上に平行に配置された作用電極、参照電極、および対電極を備えていた。作用面領域 (0.2 cm²) および対電極は、印刷した炭素で形成され、参照電極は、印刷したAg/AgClで形成されていた。酸化還元媒

介剤で、炭素作用電極を被覆した。酸化還元媒介剤は、ポリ(1-ビニルイミダゾール)とOs(4,4'-ジメトキシ-2,2'-ビピリジン):C1:とを、Os陽イオン1個に対しイミダゾール官能基15個の比率で錯化し、続いて、ポリエチレングリコールジグリシジルエーテルを用いてオスミウムポリマーをグルコースオキシダーゼと架橋して生成した。

電極を、室温で24時間硬化させた。同一平面上の電極アレーを緩衝電解液に浸し、作用電極と参照電極との間に+200mVの電位(Os(II)からOs(III)に変換するのに十分な電位)を印加した。

電位を印加すると、検出不能な1μC未満の電荷が通過した。その後の酸化還元媒介剤の還元および酸化によって、全てのOsをOs(II)からOs(III)に変換する65TC(μC)の電荷が得られた。したがって、酸化還元媒介剤中において、98%を超えるOs陽イオンが、所望の酸化状態Os(III)で存在していた。

【0330】

(実施例6)

[ポリ(4-ビニルピリジン)と錯化したOs(4,4'-ジメトキシ-2,2'-ビピリジン):C1⁺⁺⁺の酸化状態の測定]

作用電極上の酸化還元媒介剤を、ポリエチレングリコールジグリシジルエーテルを介してグルコースオキシダーゼと架橋した、Os陽イオン当たりピリジン基12個を有する、Os(4,4'-ジメトキシ-2,2'-ビピリジン):C1:のポリ(4-ビニルピリジン)との錯体に変更することを除き、実施例5と同様の実験を、同様の作用／対／参照電極形態により行った。

センサーを2個構成した。2個のセンサーの電極を、室温で24時間硬化させた。次に、電極を緩衝電解液に浸し、作用電極と参照電極との間に+200mVの電位を印加した。

電極への電位の印加により、2個のセンサーにおいて、2.5TC(μC)および3.8TC(μC)の電荷がそれぞれ通過した。その後の酸化還元媒介剤の還元および酸化により、27.9TC(μC)および28.0TC(μC)の酸化電荷がそれぞれ得られた。したがって、センサーは元々、Os陽イオンの91

%および8.6%を所望の酸化状態O₂s(III)で含んでいた。

【0331】

(実施例7)

[光学センサー]

光学センサーは、ガラススライドなどの透光性支持体上に、架橋した酵素を備えた酸化還元ポリマーフィルムを適用することによって構成される。酸化還元媒介剤の量は、測定域を満たすと予測される分析物の最大量と、(化学量論的な意味において)同等もしくはそれ以上である。スペーサー、吸収材、および対向する支持体をしっかりと締め付ける。光が組立てられたセンサーを通って光学密度検出器あるいは発光および/または蛍光検出器に達するように、試料室を適応させる。試料室が試料で満たされ、酸化還元媒介剤が酸化されると、試料室内における酸化還元媒介剤の吸収、透過、反射、あるいは発光および/または蛍光の変化を、試料中のグルコース量と相関される。

【0332】

(実施例8)

[上腕ランセットスティックからの血液体積]

本方法により得た血液体積の再現性を測定するため、一人の被験者の前腕をランセットで複数回穿孔した。各前腕の前面部分および左前腕の背面領域に30本を超えるランセットスティックを突刺したにもかかわらず、被験者は各スティックを実質的に無痛であると認識した。

前腕の穿孔は、ペイレスカラーランセット(Payless Color Lancet)を用いて行った。各スティックからの血液を1μLの毛細管を用いて収集し、血液柱の長さを測定してその体積を求めた。各スティックより得られた体積を下記の表4に示している。

【0333】

【表4】

ランセットスティックの体積

	左前腕前面 (nL)	右前腕前面 (nL)	左前腕背面 (nL)
1	180	190	180
2	250	180	300
3	170	120	310
4	150	100	300
5	100	210	60
6	50	140	980
7	90	120	220
8	130	140	200
9	120	100	380
10		100	320
11			280
12			250
13			280
14			280
Avg.	138 ± 58 nL	140 ± 40 nL	284 ± 53 nL

【 0 3 3 4 】

(実施例 9)

[拡散性酸化還元媒介剤を備えたセンサー]

ポリエスチル基板上にグラファイトインク (Graphite #G4491, Ercan, Wareham, MA) を印刷し、センサーを形成した。5.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の [O₂ (ジメチオキシビビリジン)、(ビニルイミダゾール) C1] C1 と、23.7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の PQQ グルコースデヒドロゲナーゼと、18.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ のゾニルFSO (Zonyl FSO: 登録商標) 界面活性剤 (E. I. duPont de Nemours & Co., Inc., Wilmington, DE) との混合物を、作用電極の一部分に配置した。次に、厚さ 150 μm の感圧性粘着テープを、作用電極上に、試料室を形成するため一部分のみが露出するように適用した。そして、対電極を備えた第 2 のポリエスチルフィルムを、上記感圧性粘着テープの上に配置した。対電極は、第 2 のポリエスチルフィルム上に、Ag / AgCl インク (Silver/Silver Chloride #R414, Ercan, Wareham, MA) を配置して形成した。Ag / AgCl 対電極を、PEGDGE を用いて架橋したメチル化ポリ (ビニルイミダゾール) 約 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ により被覆した。

【 0 3 3 5 】

(実施例 10)

[拡散性酸化還元媒介剤を備えたセンサーによる0Vの電位でのグルコース測定]

実施例9で述べたのと同様にセンサーを形成し、これを用いてグルコース濃度が0、90、180、270、および360mg/dLのグルコース／緩衝液を測定した。時間に渡って測定した、これら各溶液における電荷を、図15にグラフとして示している。グルコースの不存在時には、センサーは約3mg/dLのグルコース濃度を示す。図16は、各グルコース濃度について3つのセンサーで測定した、グルコース濃度に対する測定電位を示している。測定電位は、非浸出性酸化還元媒介剤を用いたセンサーにおいて観察されたのと同様に、グルコース濃度に対して直線的に変化している。

【0336】

(実施例 11)

[拡散性酸化還元媒介剤を用いて形成する他のセンサー]

ポリエステル基板上にグラファイトインク (Graphite #G4491, Ercon, Wareham, MA) を印刷し、センサーAおよびBを形成した。センサーAに関しては、8.0 μ g/cm²の[Os (ジメチオキシビリジン)；(ビニルイミダゾール) C1]C1と、34.7 μ g/cm²のPQQグルコースデヒドロゲナーゼと、26.6 μ g/cm²のゾニルFSO (Zonyl FSO: 登録商標) 界面活性剤 (E.I. duPont de Nemours & Co., Inc., Wilmington, DE) との混合物を、作用電極の一部分に配置した。センサーBに関しては、24 μ g/cm²の[Os (ジメチオキシビリジン)；(ビニルイミダゾール) C1]C1と、104 μ g/cm²のPQQグルコースデヒドロゲナーゼと、80 μ g/cm²のゾニルFSO (Zonyl FSO: 登録商標) 界面活性剤 (E.I. duPont de Nemours & Co., Inc., Wilmington, DE) との混合物を、作用電極の一部分に配置した。次に、厚さ200 μ mの感圧性粘着テープを、作用電極上に、試料室を形成するため一部分のみが露出するように適用した。そして、対電極を備えた第2のポリエステルフィルムを、上記感圧性粘着テープの上に設けた。各センサーの対電極は、第2のポリエステルフィルム上に、Ag/AgClインク (Silver/Silver Chloride #R414, Ercon,

Wareham, MA) を配置することによって形成した。A g / A g C l 対電極を、P E G D G E を用いて架橋したメチル化ポリ(ビニルイミダゾール) 約 1 0 0 μ g / cm² により被覆した。

【 0 3 3 7 】

(実施例 1 2)

[センサー内における拡散性酸化還元媒介剤量の変更]

分析物の電気分解に要する時間を測定するため、センサー A および B をそれぞれテストした。図 1 7 に結果を示している。試料内における拡散性酸化還元媒介剤の量を増加させると、センサーの応答時間が短くなった。

【 0 3 3 8 】

(実施例 1 3)

[小体積センサーの臨床的正確度]

本実施例のセンサーを、図 2 4 A, 2 4 B、および 2 4 C に示した本発明の実施形態に対応させて構成した。実施例 1 1 で述べたように、炭素作用電極を、メリネックス (Melinex: 商標) ポリエステルフィルム (DuPont, Wilmington, Delaware) 上に印刷した。上記炭素電極を、1 8 μ g / cm² の O s [(M e O), b p y], (1 - ビニルイミダゾール) C l, と、1 6 2 μ g / cm² の G D H (Toyoobo, Japan) と、1. 3 5 μ g / cm² の P Q Q (Fluka, Mila, Wisconsin) と、6 0 μ g / cm² のゾニル F S O (DuPont, Wilmington, Delaware) とで被覆した。被覆物は、1 8 °C の温度および 5 0 % の相対湿度下で作用電極に塗布した。粘着性物質 (厚さ 5 0 μ m) を、被覆された電極表面を取り囲み、幅約 0. 0 4 インチの溝を形成するように配置した。

【 0 3 3 9 】

実施例 1 1 で述べたように、2 つの A g / A g C l 対 / 参照電極を、第 2 のメリネックス (Melinex: 商標) ポリマーフィルムに印刷した。次に、フィルムを粘着性物質と作用電極フィルムとに接触させ、作用電極と 2 つの対電極を互いに対向させた。対 / 参照電極を、1 4 2 μ g / cm² のメチル化ポリビニルイミダゾールと、1 8 μ g / cm² の P E G D G E (PolySciences, Warington, Pennsylvania) と、ゾニル F S O と、7 μ g / cm² のゾニル F S O (DuPont, Wilming

ton, Delaware) により被覆した。もう一方の電極に対して上流側に位置する対電極を、試料室が満たされたことを測定するための指示電極として用いた。センサーを、ハンドローラーを3回通過させることにより積層し、CaSO₄上で、室温で3日間放置(aged)した。

【 0 3 4 0 】

センサーは、指示電極および対／参照電極との間に十分な電流が流れると、り作用電極上の溝が血液で満たされたことを示す視覚信号が外部回路より発せられるように構成した。

【 0 3 4 1 】

センサーを使用する数日前に、乾燥静電容量の測定を行い、試料室体積の均等性を調べた。静電容量のばらつきは、電極の位置ずれおよび／または粘着性物質厚さのばらつきを反映していた。測定された静電容量の中間値は7.49 pFであり、標準偏差は0.28 pFすなわち3.8%であった。測定された静電容量の最大値は8.15 pFであり、最小値は6.66 pFであった。

【 0 3 4 2 】

センサーを使用し、23名の被験者より得た血液試料中におけるグルコース濃度を測定した。この調査において、被験者の年齢は26～76歳、14名が男性、9名が女性であった。被験者のうち6名はタイプ1の糖尿病、16名はタイプ2の糖尿病と診断されており、残る1名の糖尿病の状態は不明であった。調査対象となった被験者の平均ヘマトクリット値は40.7%であり、標準偏差は3.9%であった。最大ヘマトクリット値は49%、最小ヘマトクリット値は33.2%であった。

【 0 3 4 3 】

被験者の指を突き刺して孔を開け、各被験者より血液試料を1つ収集した。この残余血液(residual blood)で、小体積センサーを満たした。

【 0 3 4 4 】

次に、2mmのケアレット(Carelet:商標)を用いて腕を切開し、被験者あたり3つの血液試料を小体積センサーに収集した。10秒以内に十分な試料が得られなかった場合は、刺切創の周囲を揉み、それからセンサーを満たした。刺切

創を揉む必要があつたのは、69個の試料のうち16個であった。

【 0 3 4 5 】

被験者あたり3つの血液試料を、静脈穿刺により収集した。少なくとも1つの試料において、YSI血液グルコース値およびヘマトクリット値を測定した。46個の小体積センサーを、これらの試料の血液で満たした。

【 0 3 4 6 】

センサーによる測定は、0mVの印加電位で行なわれた。BASポテンシオスタット (CV50W, West Lafayette, Indiana) を、試料の適用前に「オン」にし、ストリップが満たされると即座に電気分解が行なわれるようとした。電流の収集は150秒間行なわれるが（この電荷を「完全な」電気分解と称する）、ほとんどのアッセイが実質的に150秒よりかなり前に完了する。いずれの測定結果も、除外しなかった。3つの連続するセンサーにより、血液グルコースの測定を行つた。

【 0 3 4 7 】

対照用試料に関する測定を、YSI血液グルコース測定 (Yellow Springs Instruments, Model 2300 Chemical Glucose Analyzer) を用いて行つた。

【 0 3 4 8 】

静脈血に關しYSIによって得られた結果に対してデータをプロットし、データより一次関数を求めた。全てのデータは、センサー中における「完全な」(150秒間)グルコースの電気分解より得たものである。

【 0 3 4 9 】

図28は、腕より採取した血液でテストした、69個の小体積センサーより得たデータを示している。R²は0.947、平均CV(ばらつき係数)は4.8%、RMS(二乗平均)CVは5.7%であった。

【 0 3 5 0 】

図29は、指より採取した血液でテストした23個の小体積センサーより得たデータを示している。R²は0.986であった。

【 0 3 5 1 】

図30は、静脈血でテストした46個の小体積センサーより得たデータを示し

ている。R_sは0.986であった。平均C.V.は3.8%であった。RMS C.V.は4.6%であった。

【 0 3 5 2 】

本発明を、種々の特定および好適な実施形態および方法を参照して説明した。しかしながら、本発明の趣旨および範囲内において、多くの変更または改良が可能であることは、当該技術分野の通常の技術者には明らかである。

【 0 3 5 3 】

本明細書中に記載したあらゆる刊行物および特許出願は、本発明が関連する技術分野における通常の技術者の水準を示すものである。全ての刊行物および特許出願は、引照により、それぞれの刊行物または特許出願を参考として特記および別記した場合と同程度に本明細書に組み込まれる。

【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】

図1は、互いに対向する作用電極および対電極を備えた、本発明の原理に基づく電気化学センサーの第1の実施形態を示した概略図である。

【 図 2 】

図2は、同一平面上に構成された作用電極および対電極を備えた、本発明の原理に基づく電気化学センサーの第2の実施形態を示した概略図である。

【 図 3 】

図3は、互いに対向する作用電極および対電極と、伸張した試料室とを備えた、本発明の原理に基づく電気化学センサーの第3の実施形態を示した概略図である。

【 図 4 】

図4は、酸化還元媒介剤、試料室、および電極の相対位置を示す、図1または3のセンサーの一部についての、縮尺を考慮しない(not-to-scale)側断面図である。

【 図 5 】

図5は、複数の作用電極を備えた、本発明の原理に基づく電気化学センサーの第4の実施形態を示した平面図である。

【図 6】

図 6 は、試料採取手段と図 4 のセンサーとを備えた、本発明の原理に基づく分析物測定装置の一実施形態を示した斜視図である。

【図 7】

図 7 は、第 2 の電子移動剤としてグルコースオキシダーゼを備えた図 1 のセンサーを用いて、電解質の緩衝溶液（黒丸）または血清溶液（白丸）中における既知量のグルコースを電気酸化するのに必要な電荷を示したグラフである。

【図 8】

図 8 は、図 7 のデータ（緩衝溶液のみ）に関する平均グルコース濃度を、平均値に適合するように算出した検量線によって示したグラフである。線形の検量線は、10～20 mM の濃度に対して算出したものであり、二次多項式の検量線は、0～10 mM の濃度に対して算出したものである。

【図 9】

図 9 は、図 7 のグルコース測定値の臨床的な適合性を分析する、クラーク型臨床グリッド（Clark-type clinical grid）である。

【図 10】

図 10 は、第 2 の電子移動剤としてグルコースデヒドロゲナーゼを備えた図 1 のセンサーを用いて、電解質の緩衝溶液中における既知量のグルコースを電気酸化するのに要する電荷のグラフである。

【図 11】

図 11 A、11 B および 11 C は、重なり合う本発明の作用電極と対電極の、3 通りの形態を示した平面図である。

【図 12】

図 12 A および 12 B は、基材の凹部を用いて形成された、本発明の電極対の一実施形態を示した断面図である。

【図 13】

図 13 A および 13 B は、基材の凹部内に形成された、本発明の電極対の別の実施形態を示した断面図である。

【図 14】

図14Aおよび14Bは、基体の凹部および吸収材を用いて形成された、本発明の電極対のさらに別の実施形態を示した断面図である。

【図15】

図15は、拡散性酸化還元媒介剤を有するセンサーにより運搬される電荷を、複数のグルコース濃度に関し、時間の経過と共に示したグラフである。

【図16】

図16は、拡散性酸化還元媒介剤を有するセンサーにより運搬される電荷を、複数のグルコース濃度に関して示したグラフである。

【図17】

図17は、拡散性酸化還元媒介剤の量が異なる複数のセンサーにより運搬される電荷を、時間の経過と共に示したグラフである。

【図18】

図18Aは、本発明の第5実施形態のセンサーに使用される作用電極を有する第1フィルムの正面図である。図18Bは、図18Aに示した第1フィルムに配置するスペーサーの正面図である。図18Cは、図18Bのスペーサーおよび図18Aの第1フィルムの上に配置する、対電極を有する第2フィルムの底面図（図18Aおよび18Bに対する表裏反転図）である。

【図19】

図19Aは、本発明の第6実施形態のセンサーに使用される作用電極を有する第1フィルムの正面図である。図19Bは、図19Aに示した第1フィルムに配置するスペーサーの正面図である。図19Cは、図19Bのスペーサーおよび図19Aの第1フィルムの上に配置する、対電極を有する第2フィルムの底面図（図19Aおよび19Bに対する表裏反転図）である。

【図20】

図20Aは、本発明の第7実施形態のセンサーに使用される作用電極を有する第1フィルムの正面図である。図20Bは、図20Aに示した第1フィルムに配置するスペーサーの正面図である。図20Cは、図20Bのスペーサーおよび図20Aの第1フィルムの上に配置する、対電極を有する第2フィルムの底面図（図20Aおよび20Bに対する表裏反転図）である。

図21Aは、本発明の第8実施形態のセンサーに使用される作用電極を有する第1フィルムの正面図である。

【図21】

図21Bは、図21Aに示した第1フィルムに配置するスペーサーの正面図である。図21Cは、図21Bのスペーサーおよび図21Aの第1フィルムの上に配置する、対電極を有する第2フィルムの底面図（図21Aおよび21Bに対する表裏反転図）である。

【図22】

図22Aは、本発明の第9実施形態のセンサーに使用される作用電極を有する第1フィルムの正面図である。図22Bは、図22Aに示した第1フィルムに配置するスペーサーの正面図である。図22Cは、図22Bのスペーサーおよび図22Aの第1フィルムの上に配置された対電極を有する第2フィルムの底面図（図22Aおよび22Bに対する表裏反転図）である。

【図23】

図23Aは、本発明の第10実施形態のセンサーに使用される作用電極を有する第1フィルムの正面図である。図23Bは、図23Aに示した第1フィルムに配置するスペーサーの正面図である。図23Cは、図23Bのスペーサーおよび図23Aの第1フィルムの上に配置する、対電極を有する第2フィルムの底面図（図23Aおよび23Bに対する表裏反転図）である。

【図24】

図24Aは、本発明の第11実施形態のセンサーに使用される作用電極を有する第1フィルムの正面図である。図24Bは、図24Aに示した第1フィルムに配置するスペーサーの正面図である。図24Cは、図24Bのスペーサーおよび図24Aの第1フィルムの上に配置する、対電極を有する第2フィルムの底面図（図24Aおよび24Bに対する表裏反転図）である。

【図25】

図25は、本発明の電気化学センサーの第12実施形態を示した正面図である。

【図26】

図 26 は、一体型の試料採取および分析物測定装置の一実施形態を示した斜視図である。

【図 27】

図 27 は、本発明の電気化学センサーの第 13 実施形態を示した断面図である。

【図 28】

図 28 は、被験者の腕より収集した血液試料中の分析物濃度の本発明のセンサーによる測定値を、標準的な血液テストによる測定値と比較したグラフである。

【図 29】

図 29 は、被験者の指より収集した血液試料中の分析物濃度の本発明のセンサーによる測定値を、標準的な血液テストによる測定値と比較したグラフである。

【図 30】

図 30 は、静脈血試料中の分析物濃度の本発明のセンサーによる測定値を、標準的な血液テストによる測定値と比較したグラフである。

【図 31】

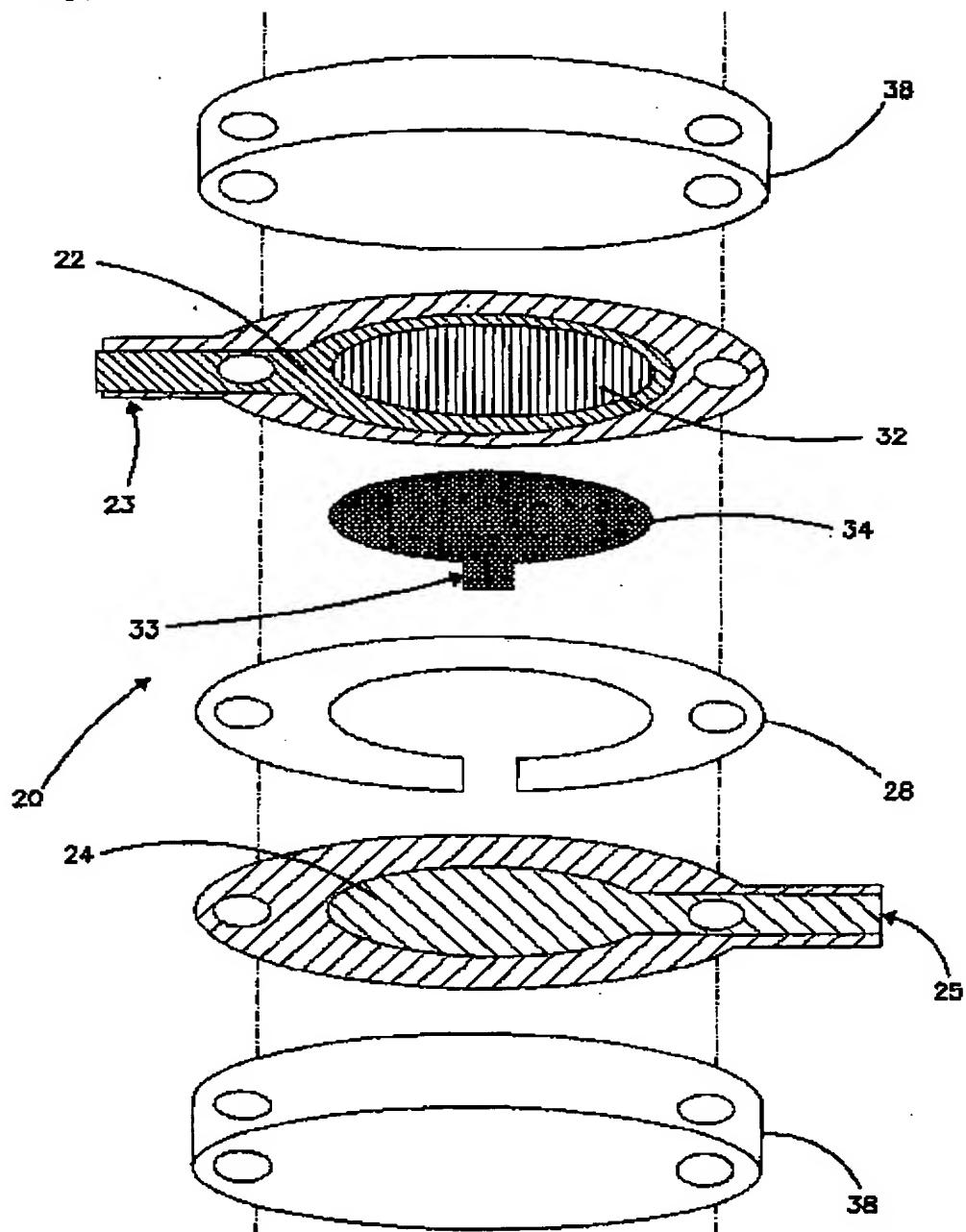
図 31 A は、本発明のセンサー構成部品のシートの一実施例を示した正面図である。図 31 B は、本発明のセンサー構成部品のシートの別の実施例を示した正面図である。

【図 32】

図 32 は、測定器内に配置された本発明のセンサーを、測定器内部より見た状態を示した断面図である。

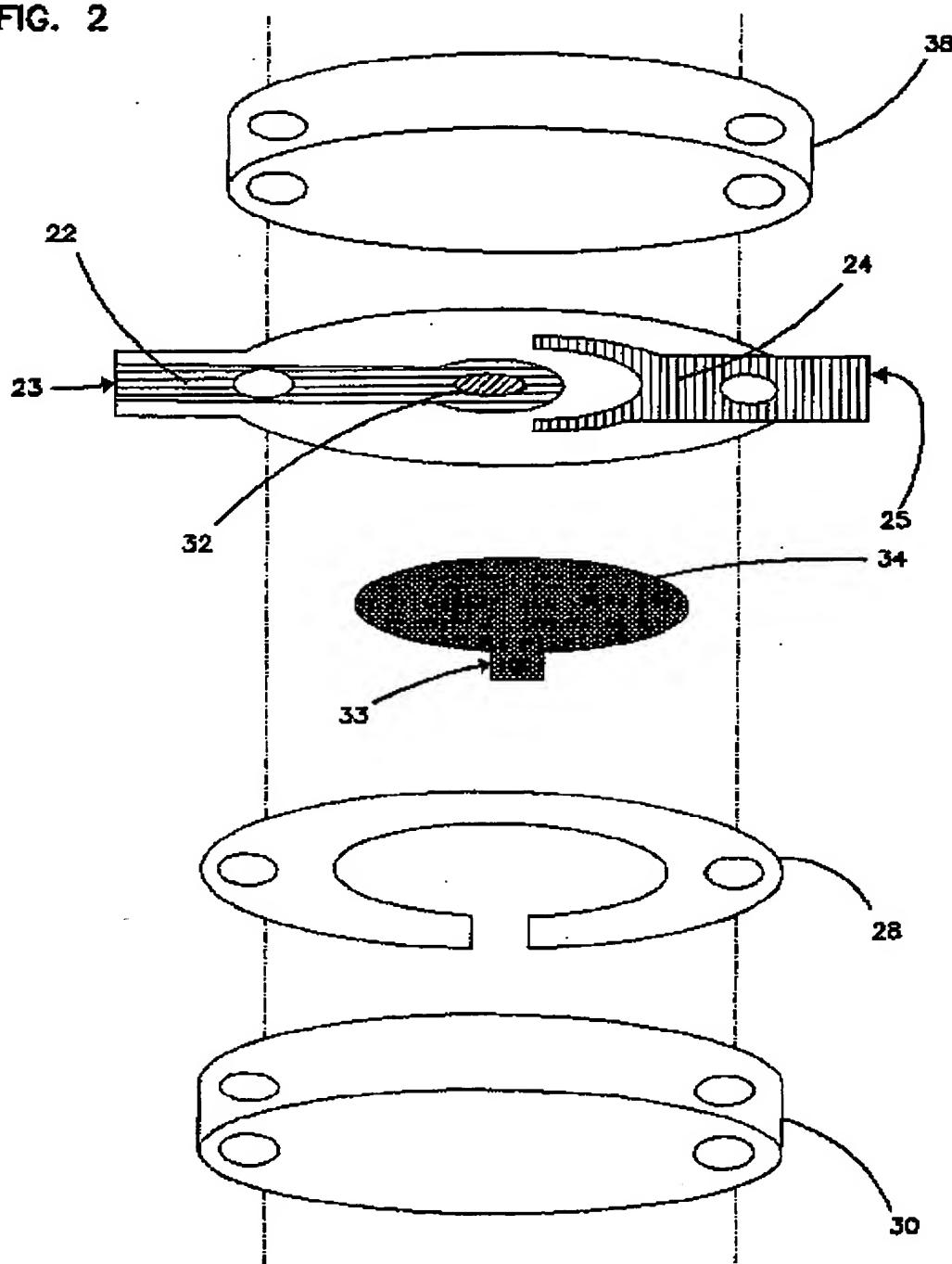
【図 1】

FIG. 1



【図 2】

FIG. 2



【図 3】

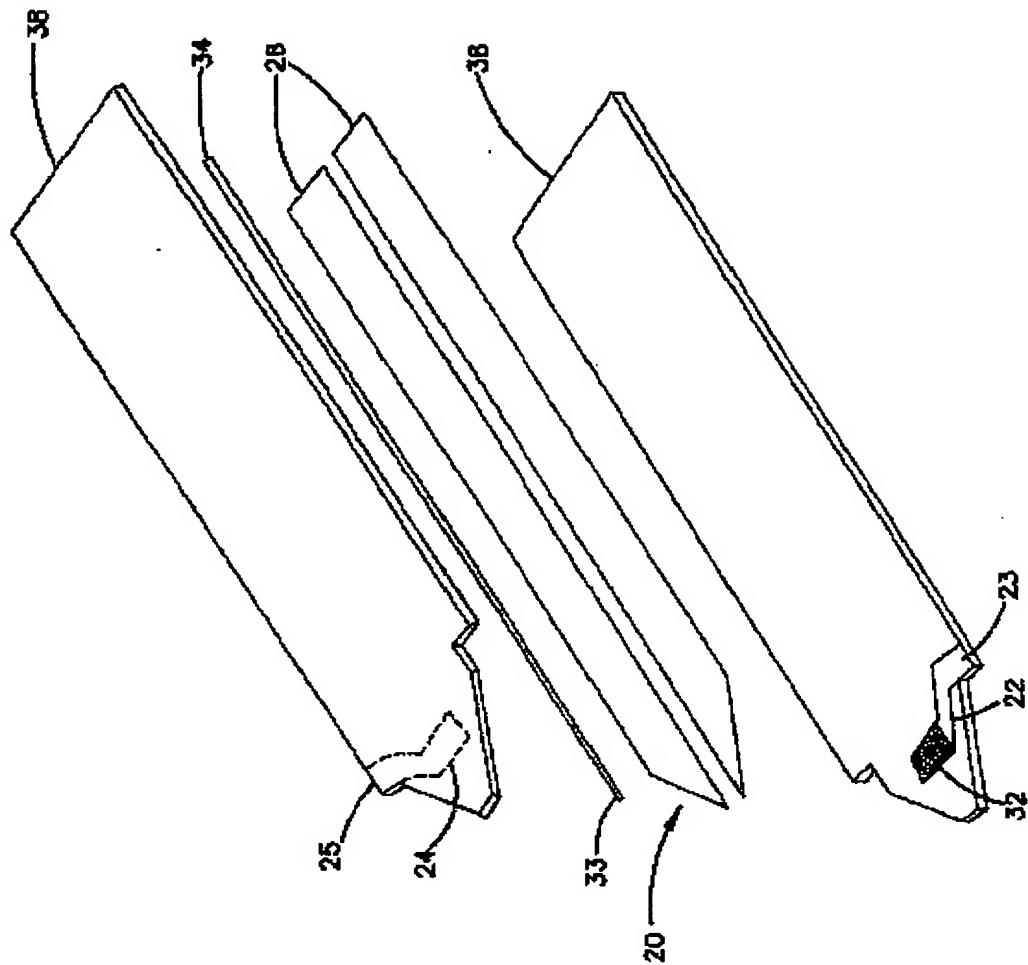


FIG. 3

【図 4】

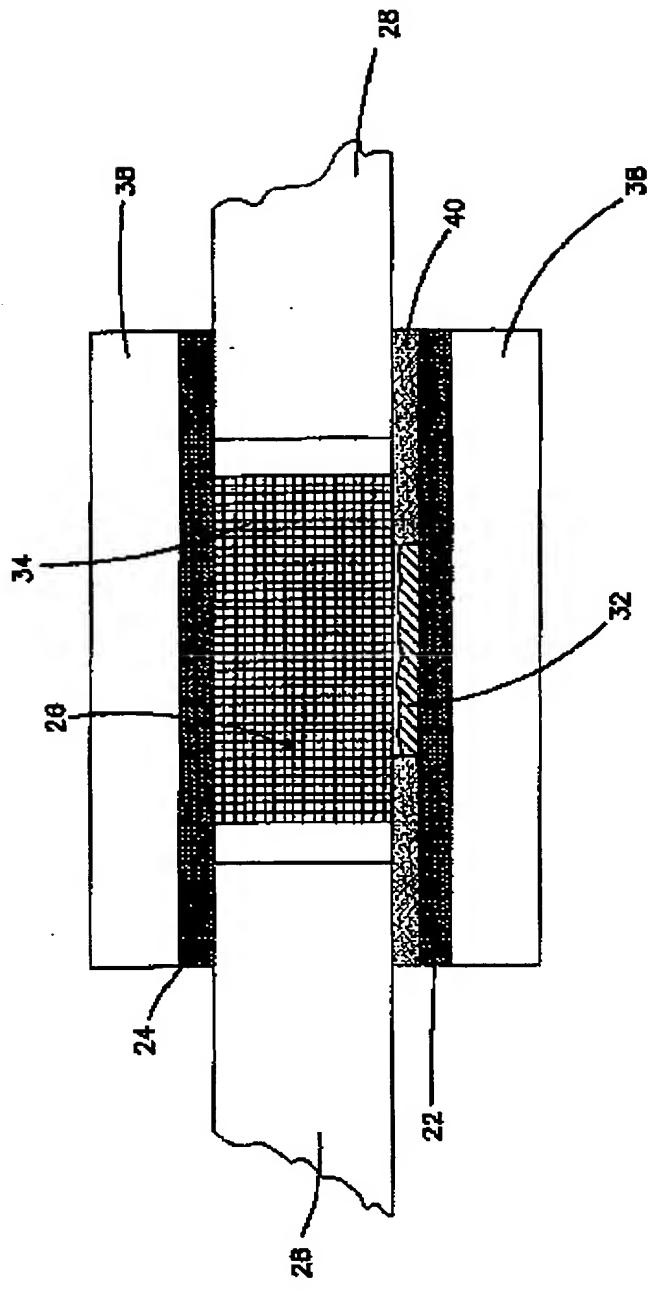
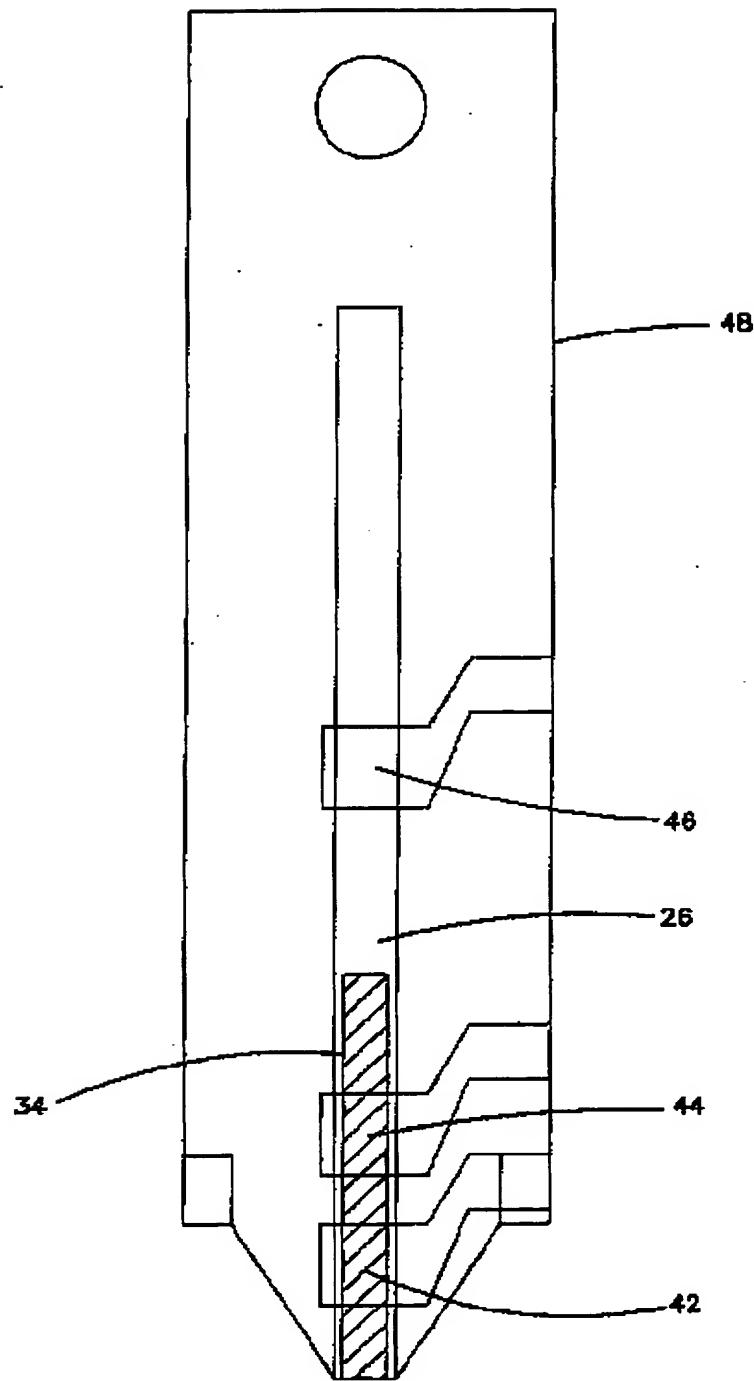


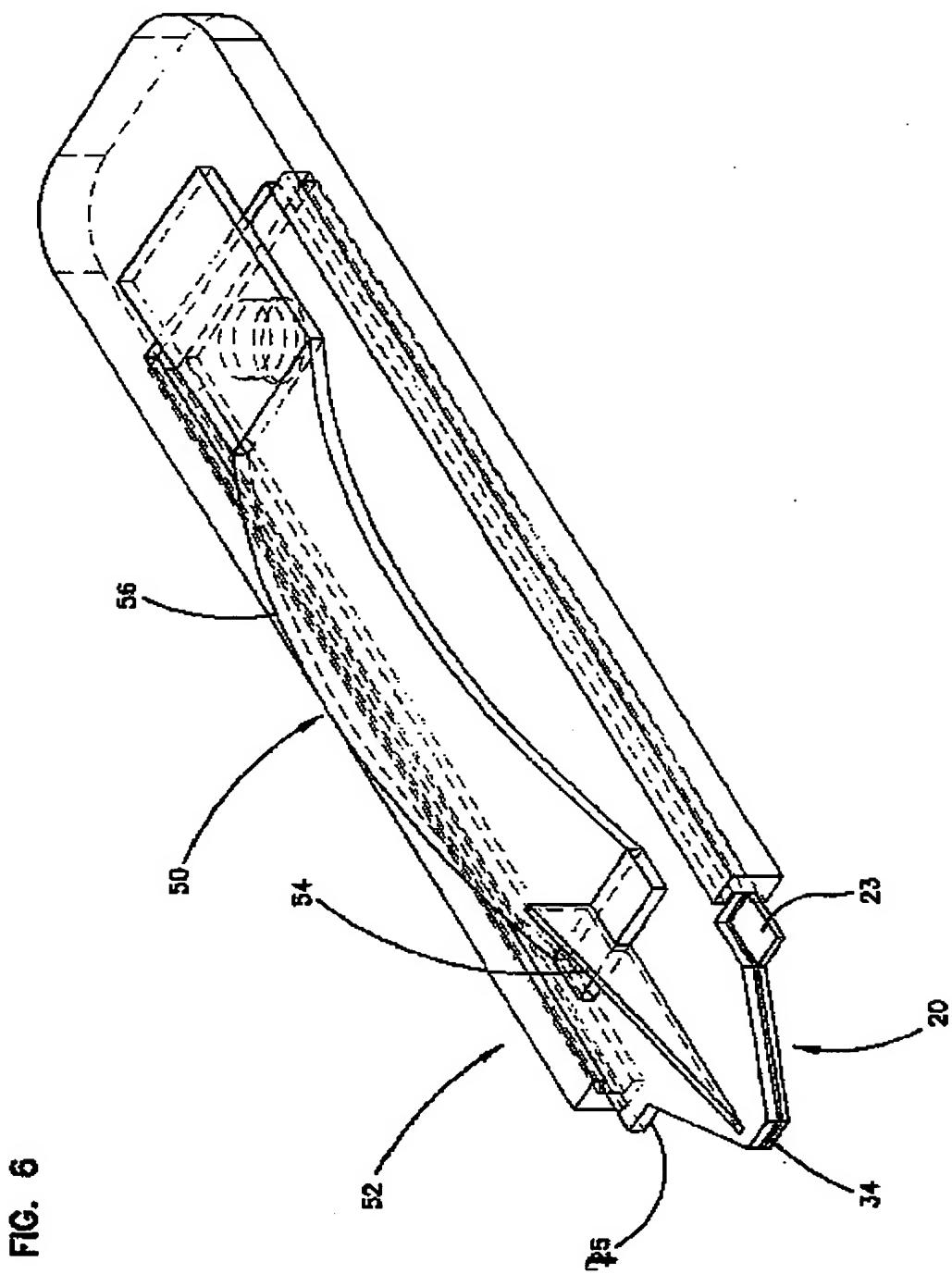
FIG. 4

【図 5】

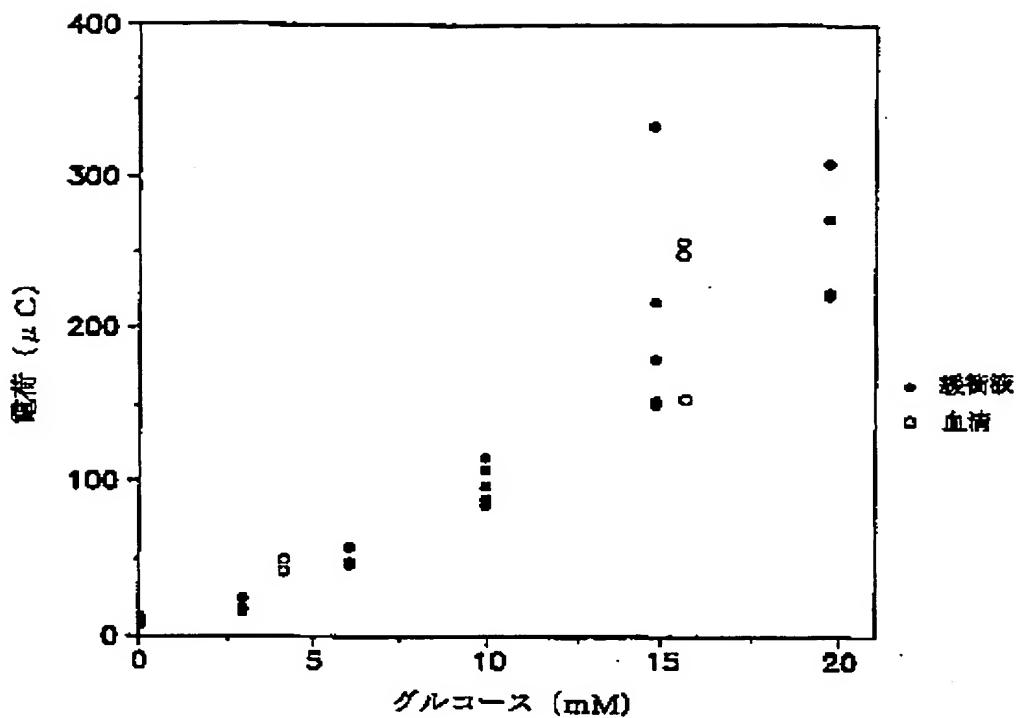
FIG. 5



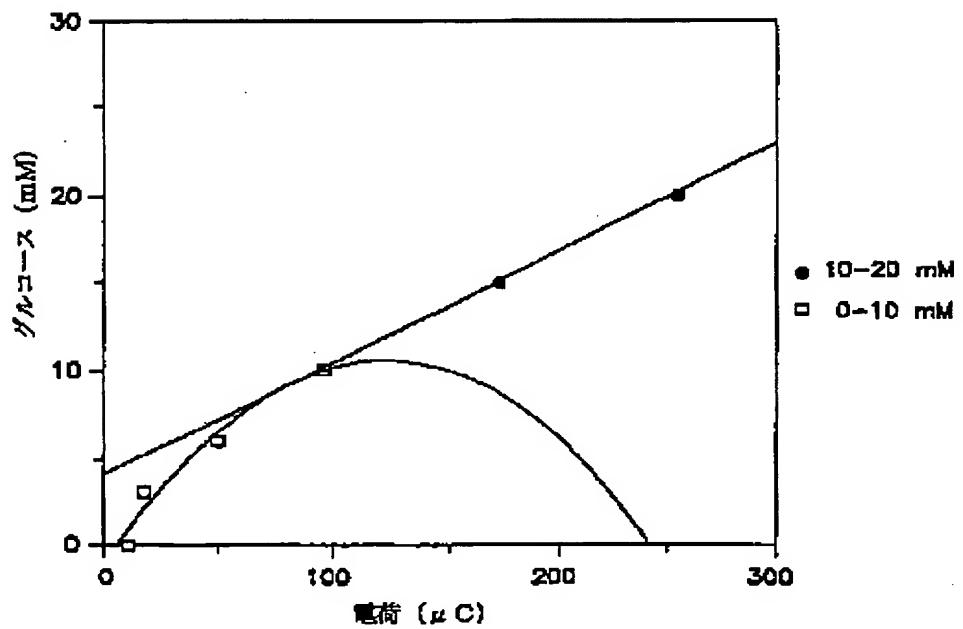
【図 6】



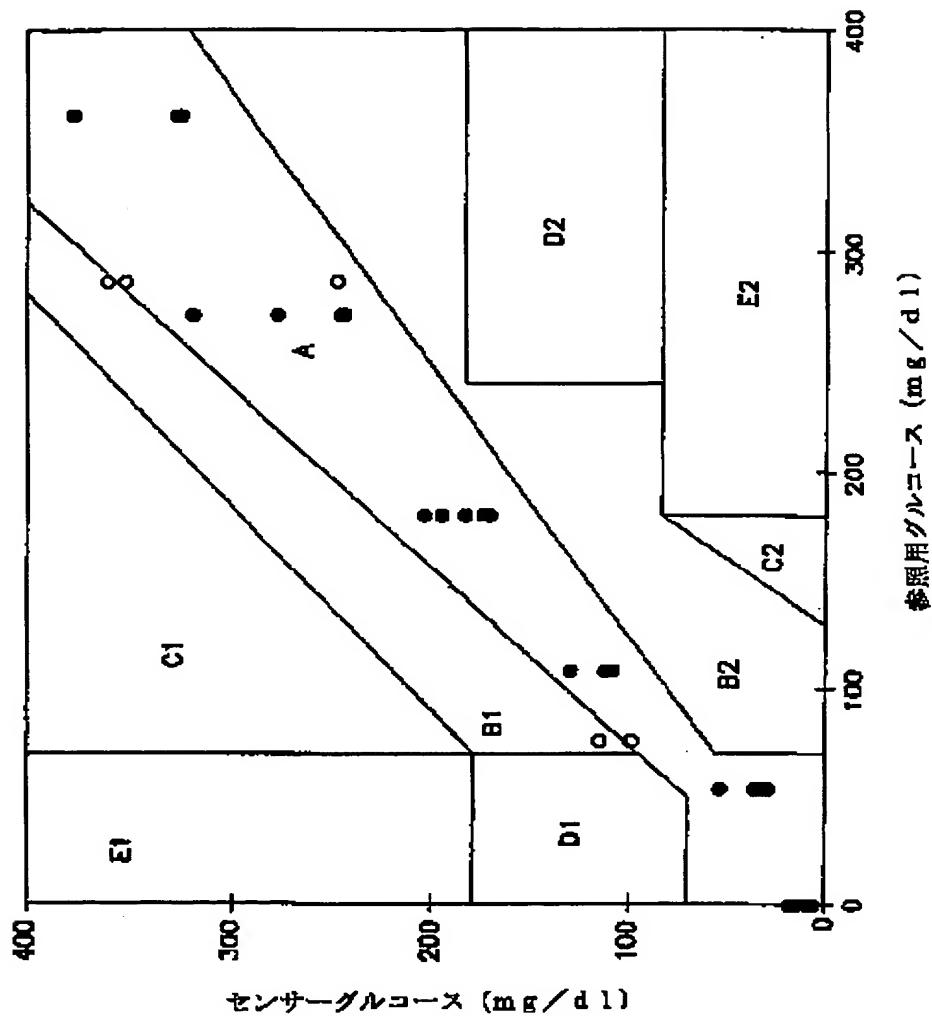
【図 7】



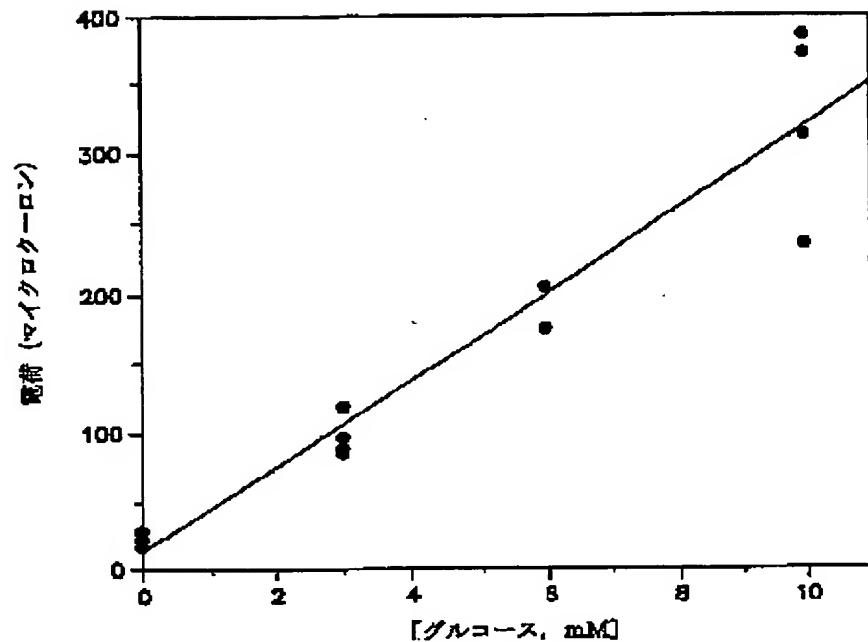
【図 8】



【図 9】



【図 10】



【図 11A】

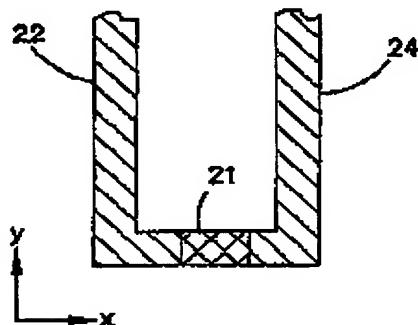


FIG. 11A

【図 11B】

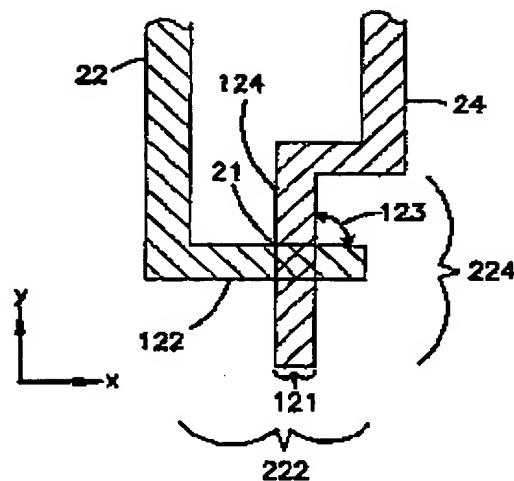


FIG. 11B

【図 11C】

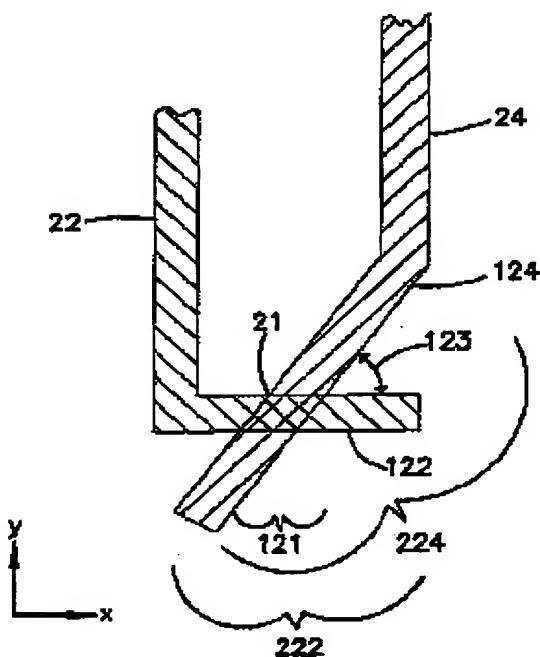


FIG. 11C

[図 1 2 A]



FIG. 12A

[図 1 2 B]

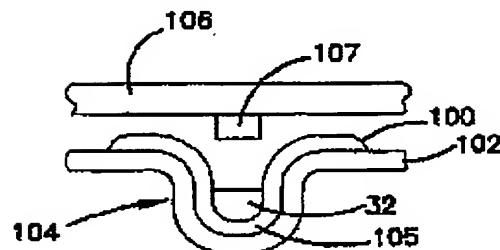


FIG. 12B

[図 1 3 A]



FIG. 13A

[図 1 3 B]

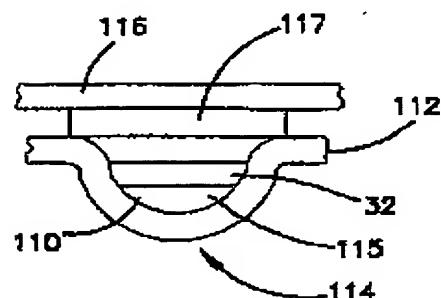


FIG. 13B

[図 14 A]

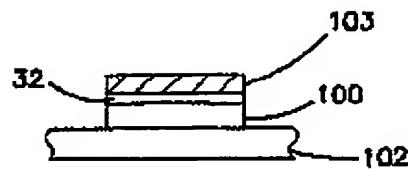


FIG. 14A

[図 14 B]

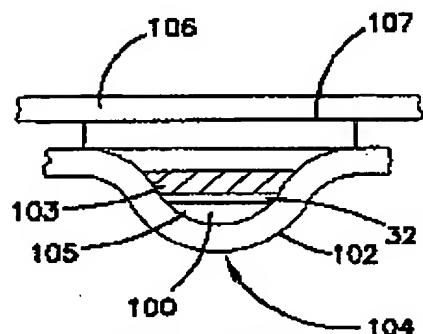
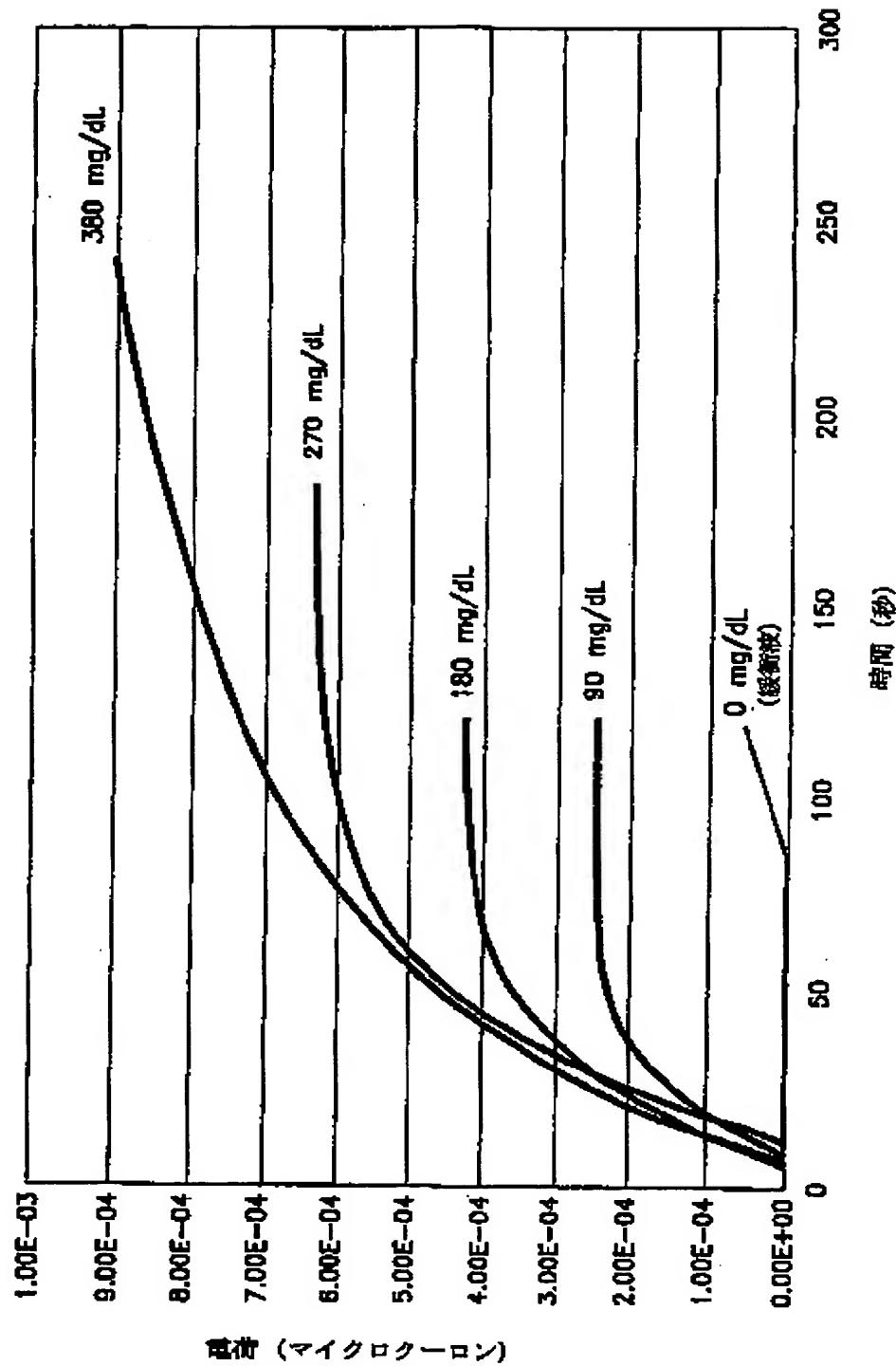
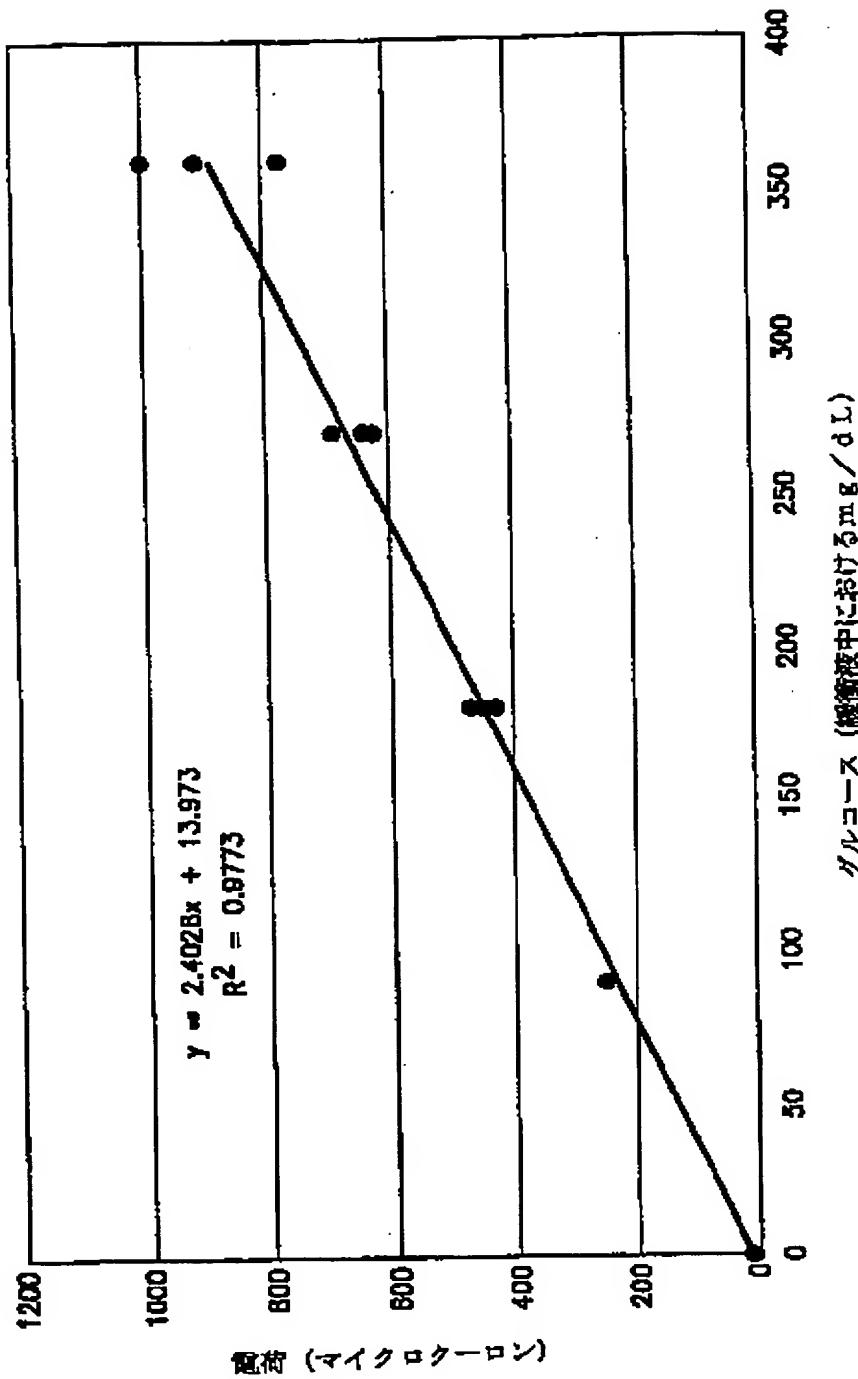


FIG. 14B

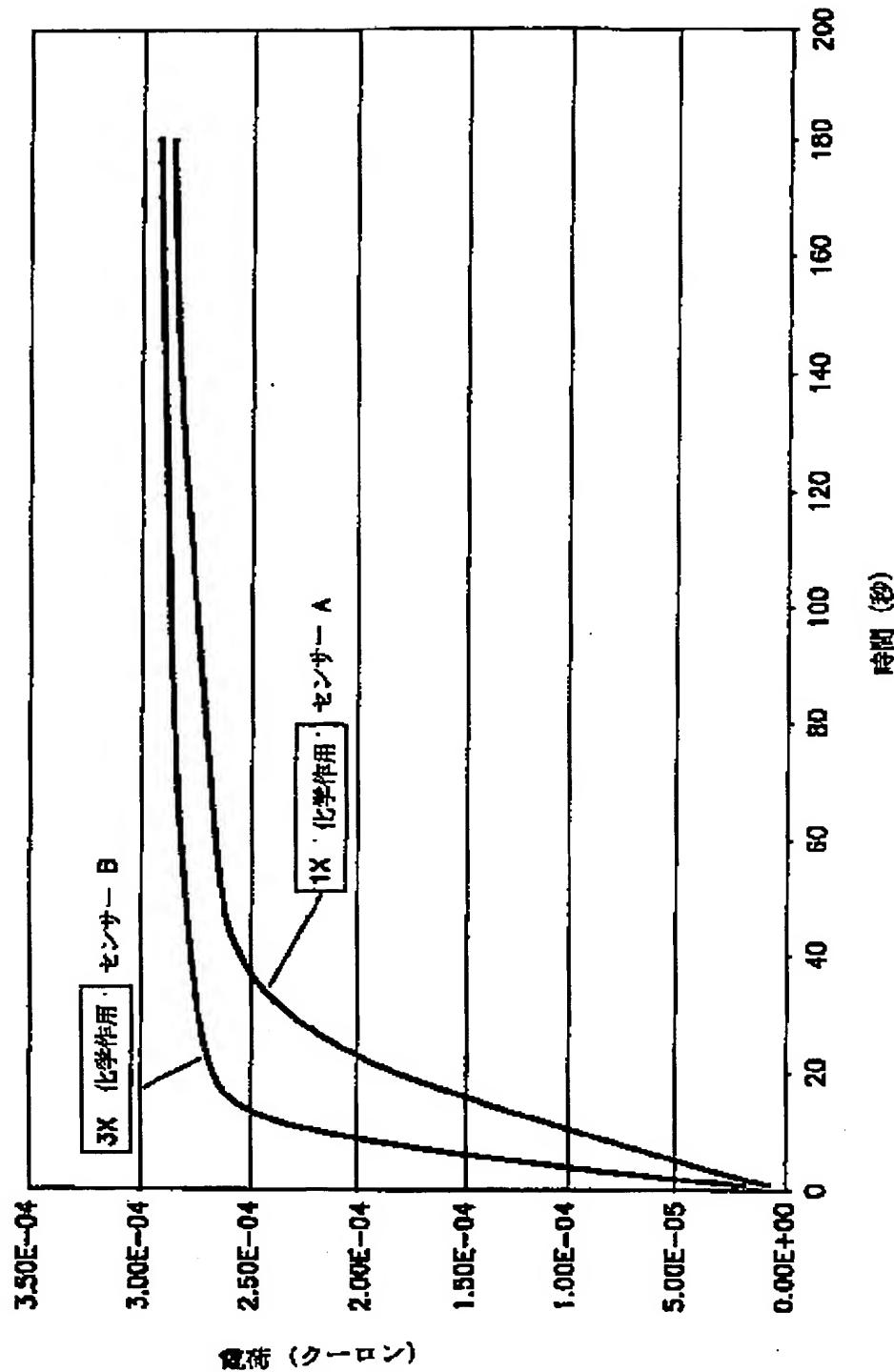
[図 1 5]



【図 16】



[図 17]



【図 18A】

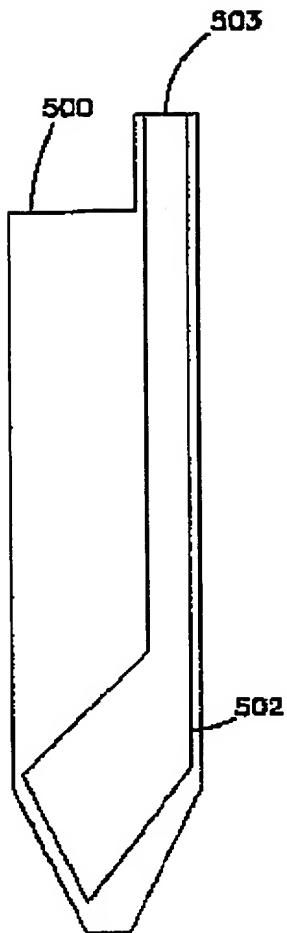


FIG. 18A

【図 18B】

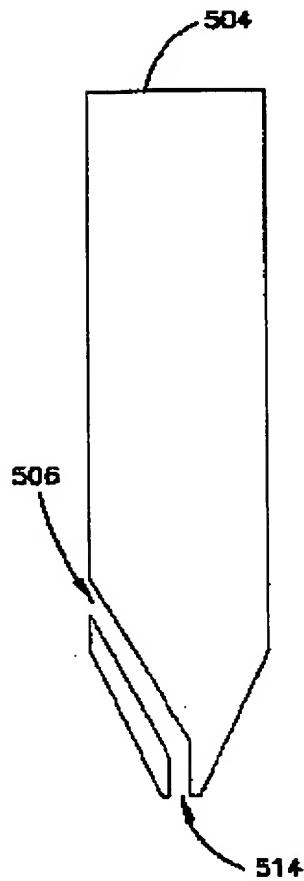


FIG. 18B

【図 18C】

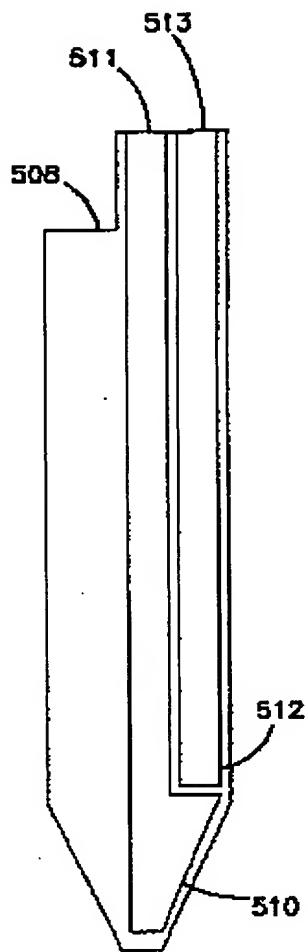


FIG. 18C

【図 19A】

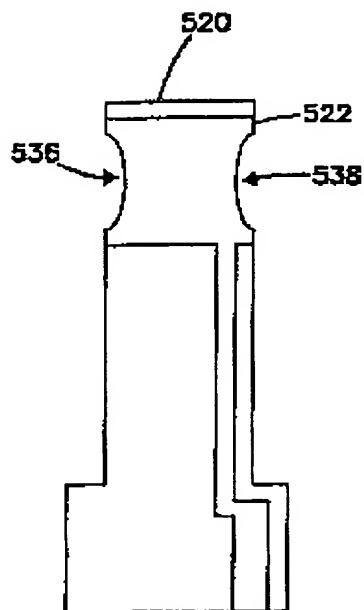


FIG. 19A

【図 19B】

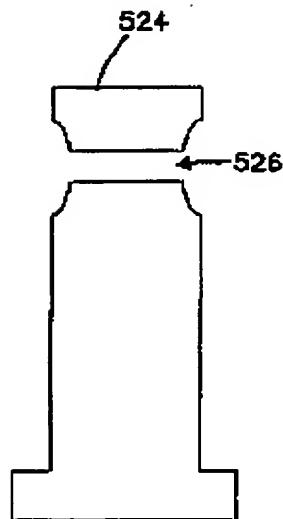


FIG. 19B

【図 19C】

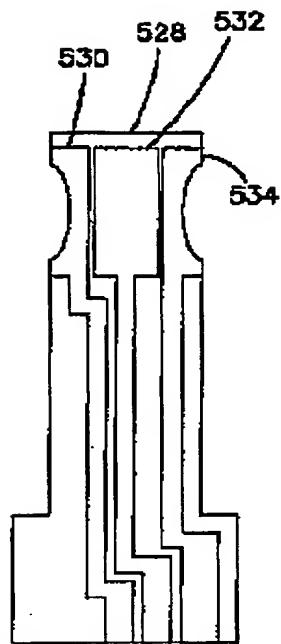


FIG. 19C

【図20A】

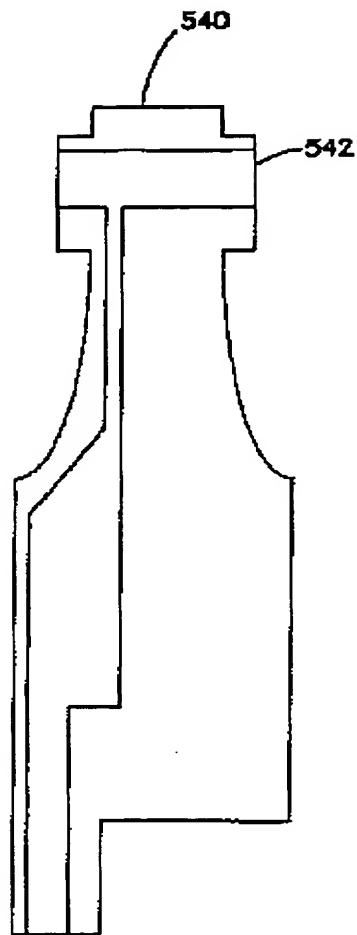


FIG. 20A

【図20B】

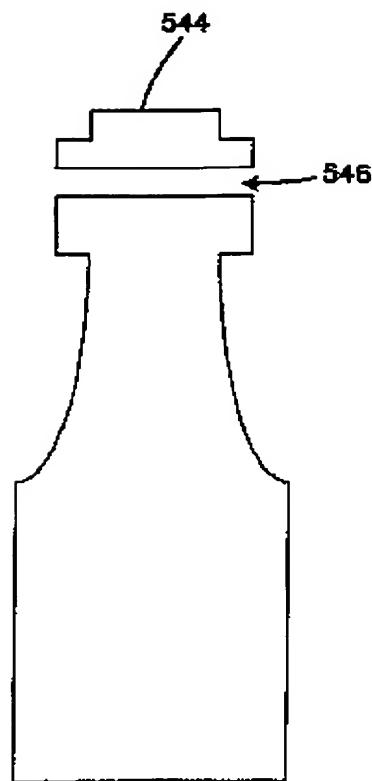


FIG. 20B

【図 20C】

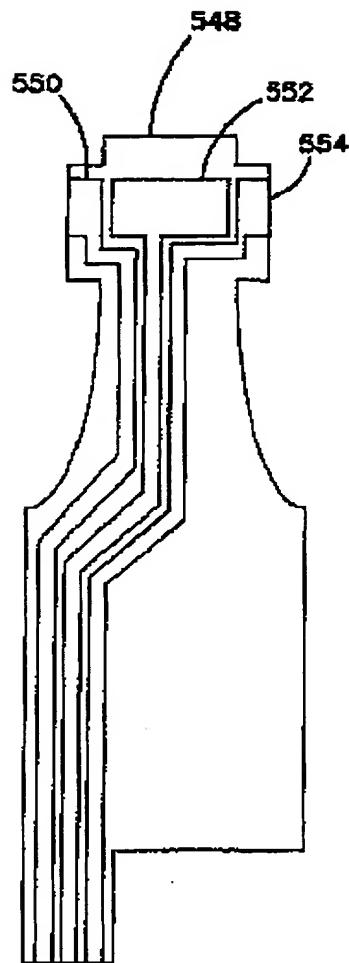


FIG. 20C

【図 21A】

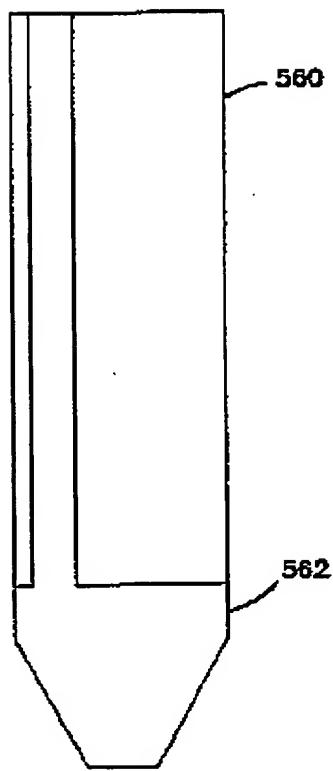


FIG. 21A

【図21B】

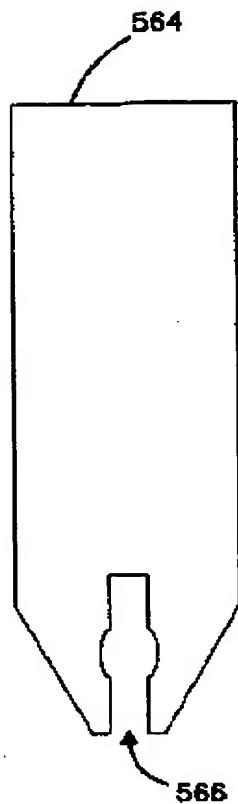


FIG. 21B

【図 21C】

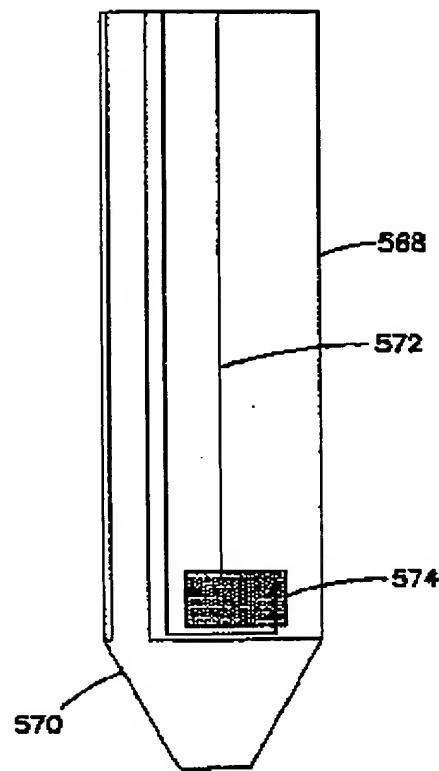


FIG. 21C

【図22A】

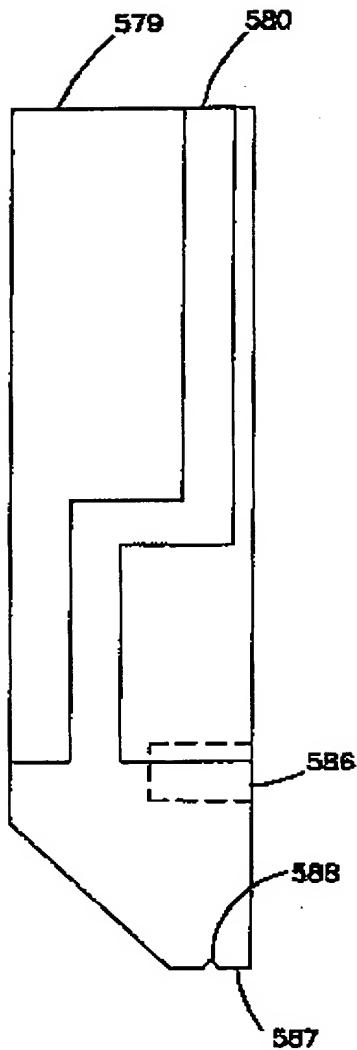


FIG. 22A

【図22B】

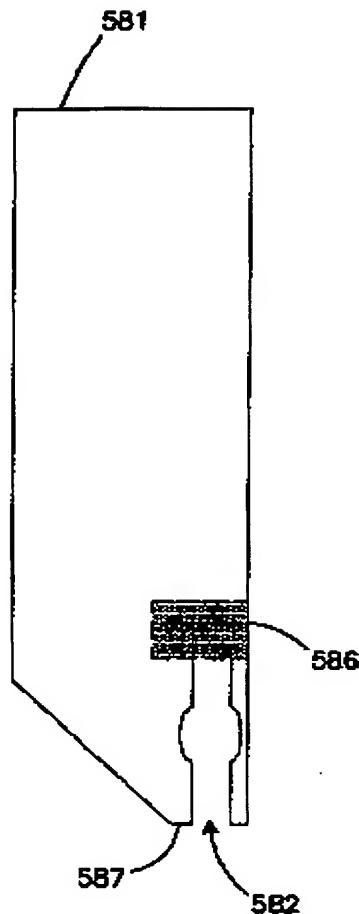


FIG. 22B

【図22C】

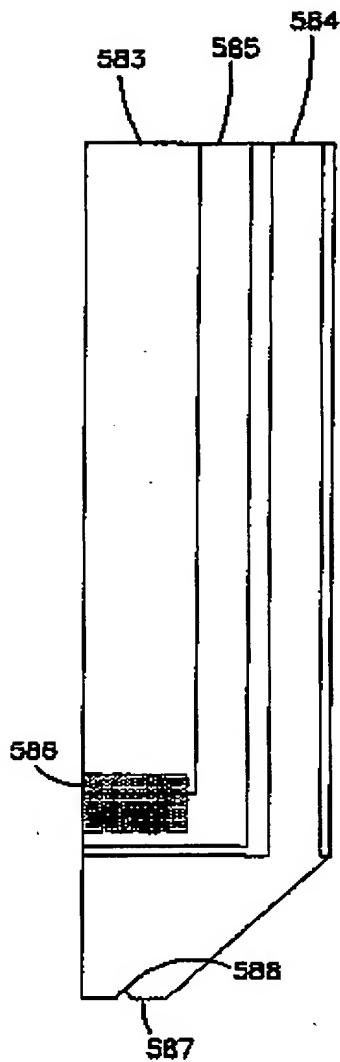


FIG. 22C

【図 23A】

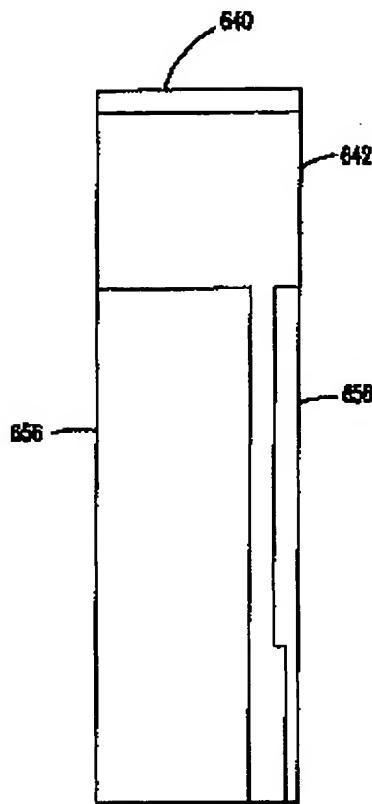


FIG. 23A

【図 2 3 B】

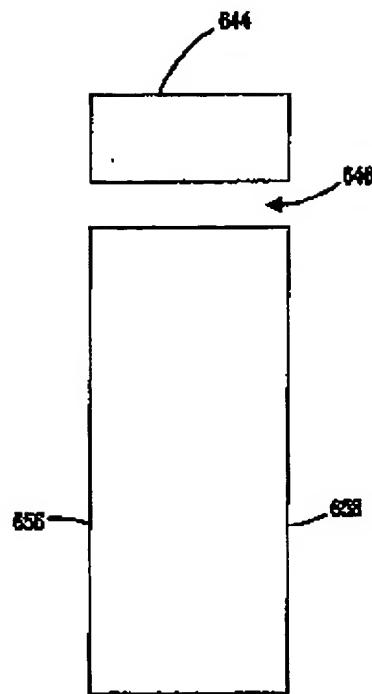


FIG. 23B

【図23C】

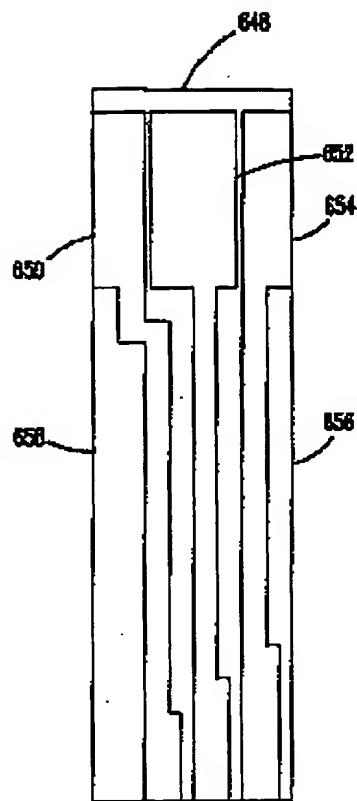


FIG. 23C

【図 24 A】

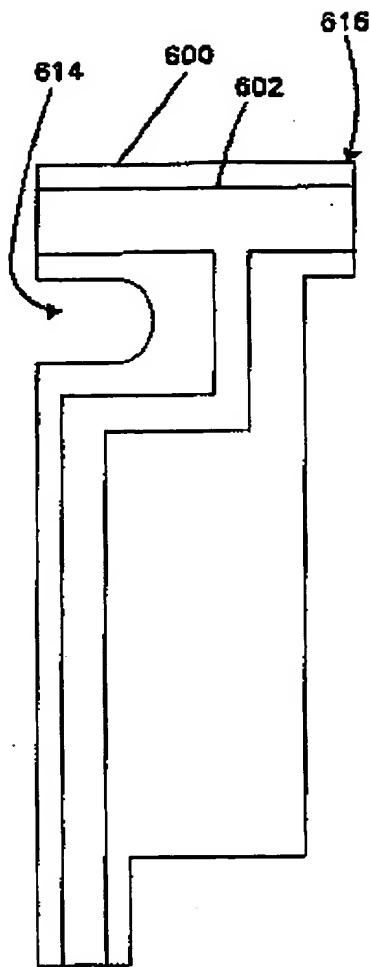


FIG. 24A

【図24B】

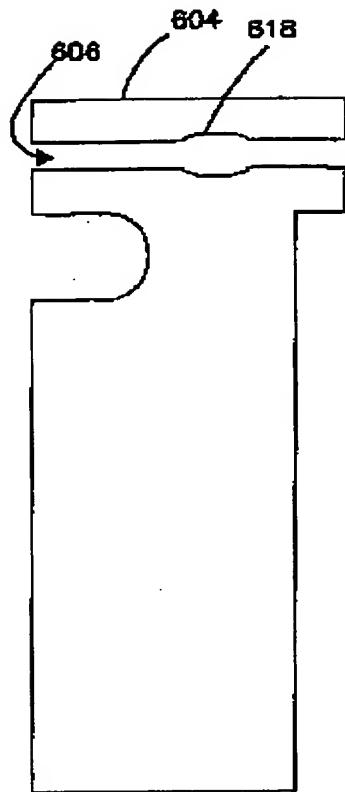


FIG. 24B

【図24C】

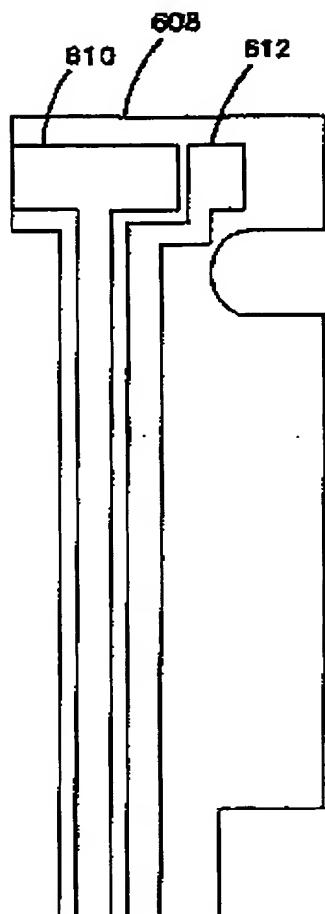


FIG. 24C

【図25】

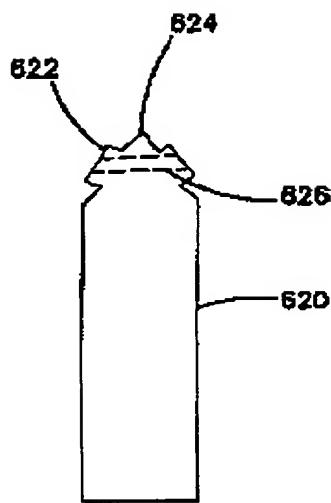


FIG. 25

【図26】

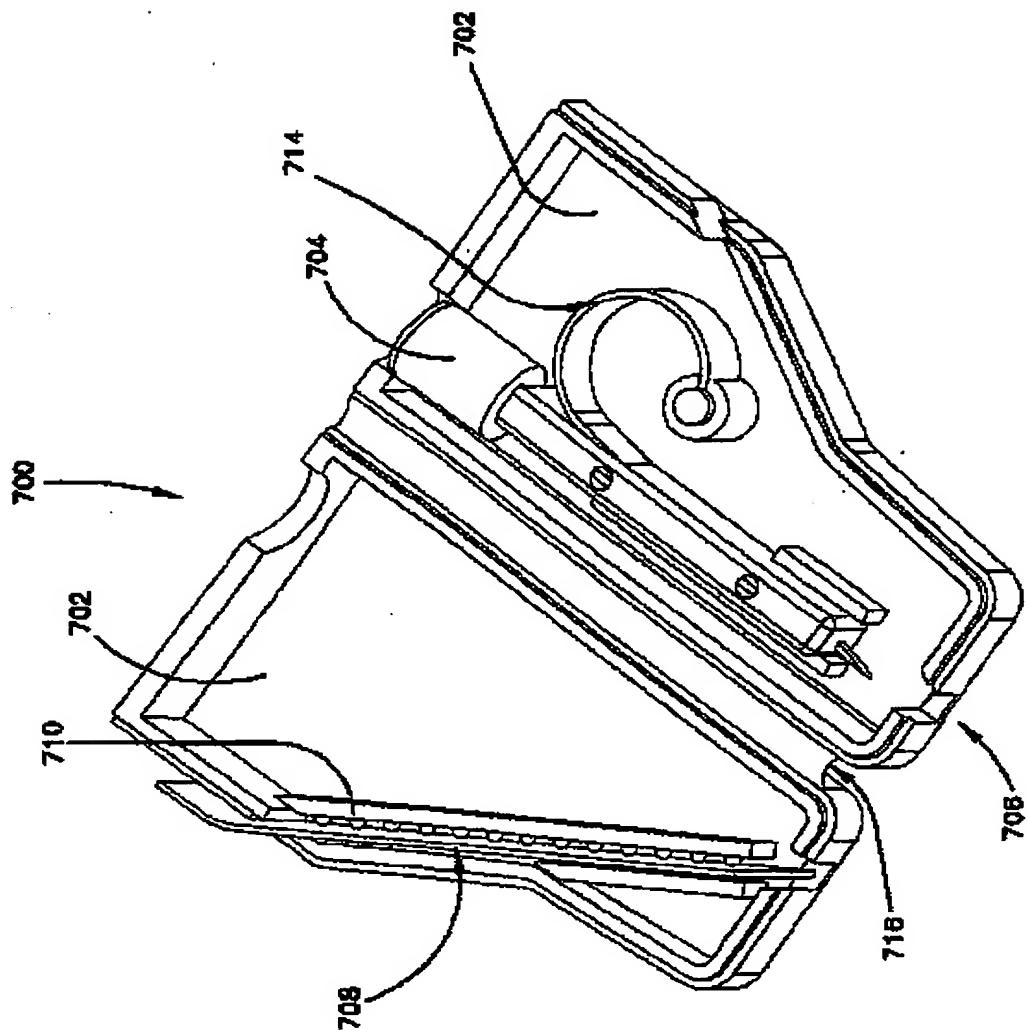


FIG. 26

【図 27】

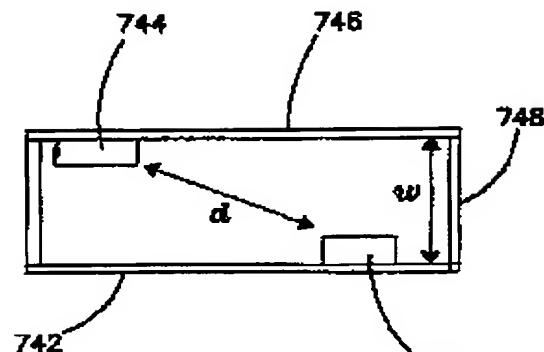
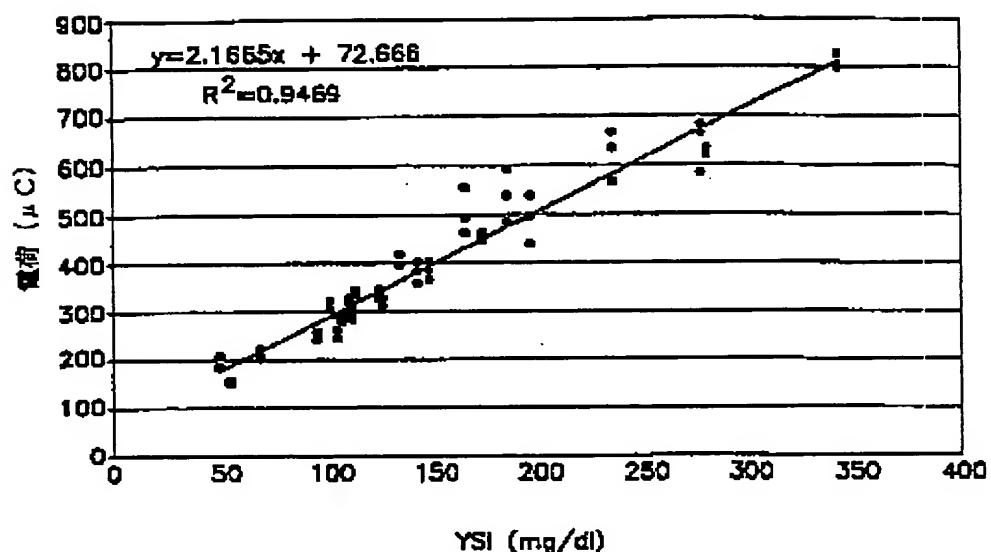
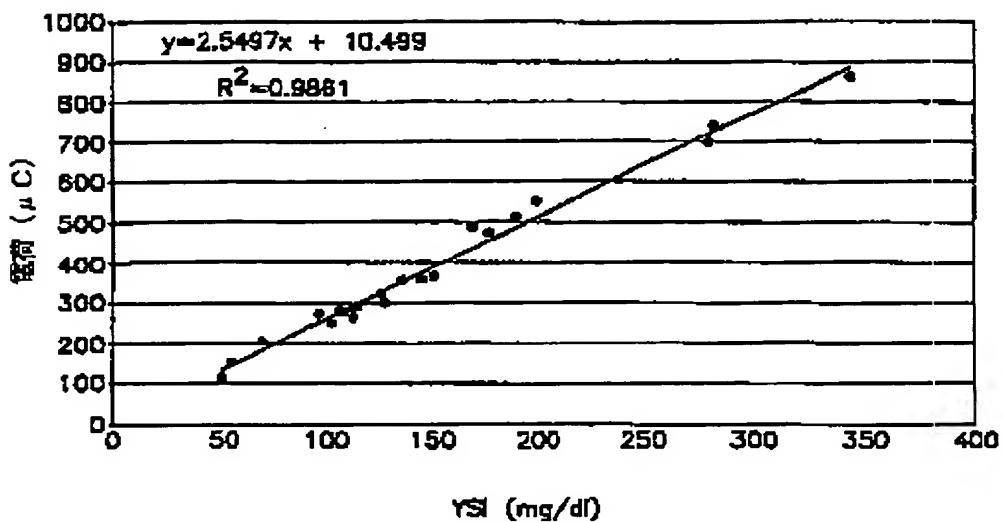


FIG. 27

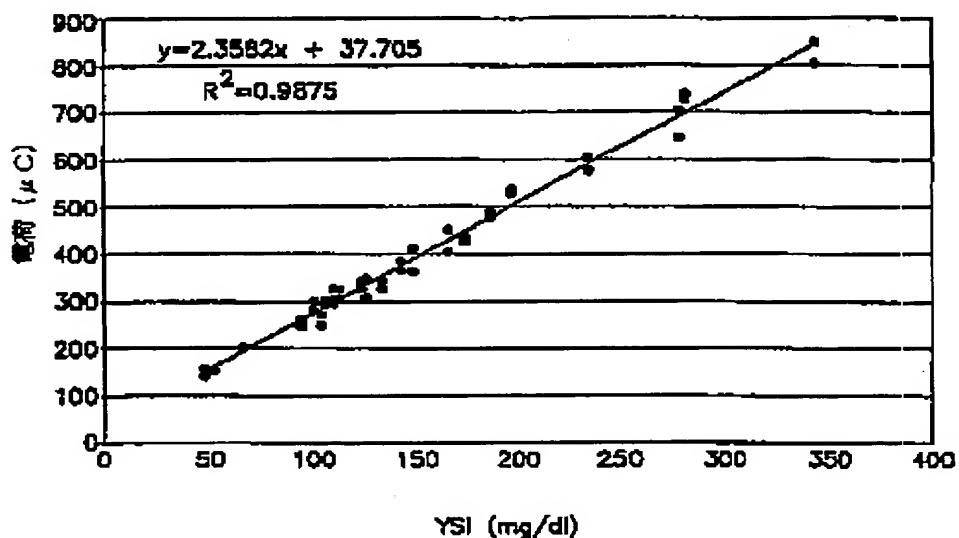
【図 28】



[図 29]



[図 30]



【図 31 A】

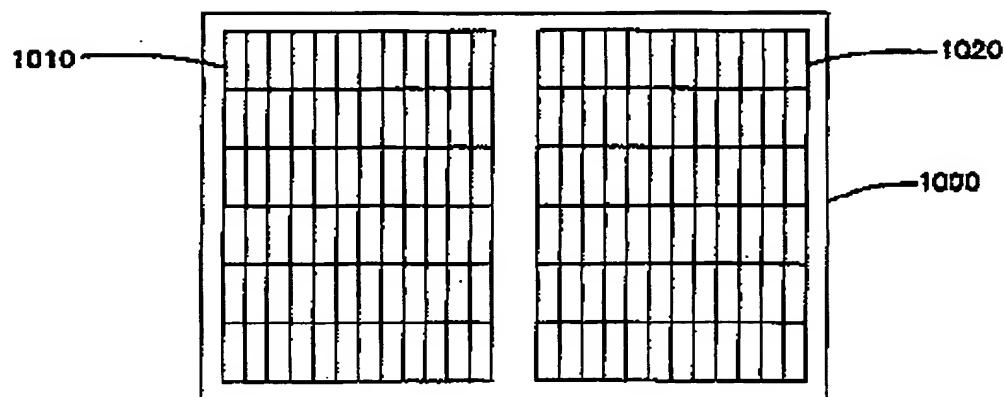


FIG. 31A

【図 31 B】

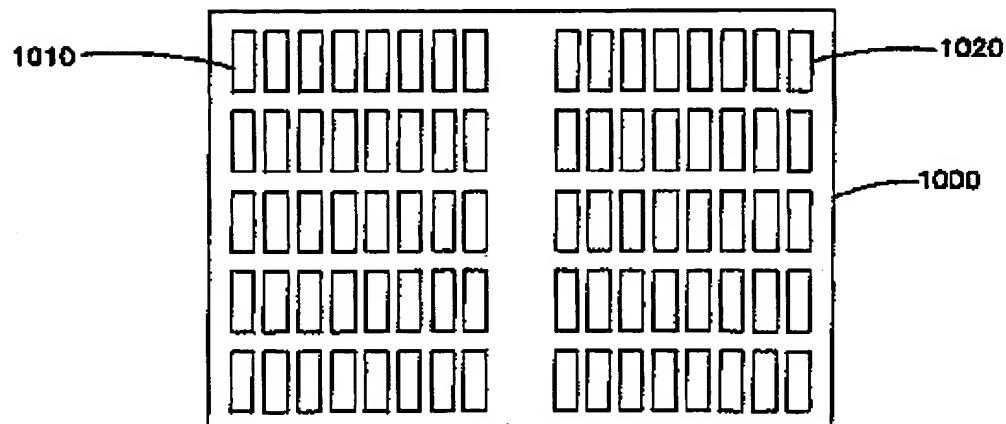


FIG. 31B

【図 32】

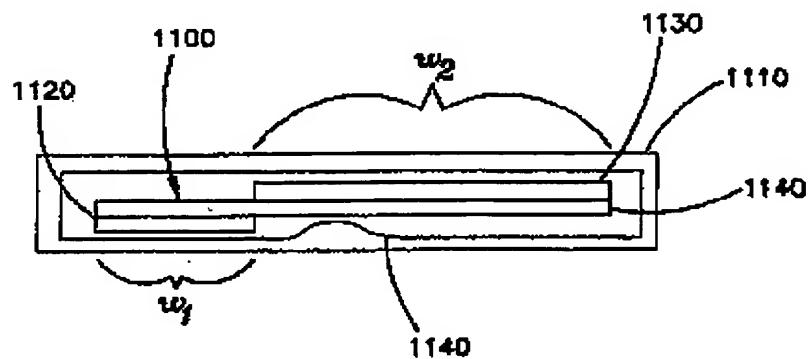


FIG. 32

【手続補正書】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成12年10月6日(2000.10.6)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】作用電極と対電極とを含み、前記作用電極の少なくとも一部が前記対電極の少なくとも一部から $200\mu\text{m}$ 以下の距離内にあり、前記対電極が任意に対／参照電極である電極対と、

任意に設けられる参照電極と、

試料液を、前記作用電極と、前記対電極と、前記参照電極が設けられていれば前記参照電極とに電解的に接触させて保持するための試料室と、

前記測定域内に配置された分析物応答性酵素および拡散性酸化還元媒介剤とを備え、

前記試料室は、前記作用電極と、前記対電極と、前記参照電極が設けられていれば前記参照電極とに隣接する約 $1\mu\text{L}$ 以下の体積の試料液を収容する大きさに設定された測定域を含み、任意に約 $1\mu\text{L}$ 以下の体積の試料液を収容する大きさに設定されており、

前記拡散性酸化還元媒介剤によって発生するバックグラウンド信号が、

(a) 平均的な生理学的正常量の分析物の酸化または還元によって発生する信号の5倍以下、または

(b) 平均的な生理学的正常量からの平均偏差に相当する量の分析物の酸化または還元によって発生する信号の5倍以下となるように構成および配置された、試料液中における分析物濃度を測定するためのセンサー。

【請求項2】作用電極と対電極とを含み、前記作用電極と前記対電極との間の最短距離が $25\sim1000\mu\text{m}$ の範囲である電極対と、

試料液を保持するための、前記作用電極と前記対電極とに隣接する約 $1\mu\text{L}$ 以

下の体積の試料を収容する大きさに設定された測定域を含む試料室と、

前記測定域内に配置された分析物応答性酵素および拡散性酸化還元媒介剤とを備え、

前記拡散性酸化還元媒介剤によって発生するバックグラウンド信号が、5 m·Mの分析物の酸化または還元によって発生する信号の5倍以下となるように構成および配置された、試料液中における分析物濃度を測定するためのセンサー。

【請求項3】 前記拡散性酸化還元媒介剤によって発生するバックグラウンド信号が、平均的な生理学的正常量の分析物の酸化または還元によって発生する信号と同等か、またはそれを下回るように構成および配置された請求項1および2のいずれか1項に記載の記載のセンサー。

【請求項4】 前記拡散性酸化還元媒介剤によって発生するバックグラウンド信号が、前記分析物の酸化または還元によって発生する信号の25%以下、より好ましくは5%以下となるように構成および配置された請求項1および2のいずれか1項に記載の記載のセンサー。

【請求項5】 (a) 基部側の端部と末端側の端部とを有し、前記基部側の端部から前記末端側の端部にむかって伸びる前記電気化学センサーの第1側縁部と第2側縁部とを定め、前記末端側の端部がセンサー読取装置に挿入されるように構成および配置された第1基板と、

(b) 前記第1基板の上方に配置される第2基板と、

(c) 前記第1および第2基板の間に配置され、前記センサーの前記第1側縁部に沿った第1孔と前記第2側縁部に沿った第2孔とを定め、前記試料室が前記第1孔から第2孔にまで達しているスペーサーと、

(d) 前記第1および第2基板のいずれか1つに配置され、前記測定域または前記試料室がいつ試料を収容したかを測定するため、前記測定域または前記試料室のいずれかを基準にして配置された少なくとも1つの指示電極とを備え、

前記作用電極が前記第1および第2基板のいずれか1つに配置され、前記対電極が前記第1および第2基板のいずれか1つに配置されている請求項1～4のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項6】 (a) 基部側の端部と末端側の端部とを有し、前記基部側の端

部から前記末端側の端部にむかって伸びる前記電気化学センサーの第1側縁部と第2側縁部とを定め、前記末端側の端部がセンサー読取装置に挿入されるように構成および配置された第1基板と、

(b) 前記第1基板の上方に配置される第2基板と、

(c) 前記第1および第2基板の間に配置され、前記センサーの前記基部側の端部に沿った第1孔と前記第1側縁部に沿った第2孔とを定め、前記試料室が前記第1孔から第2孔にまで達しているスペーサーと、

(d) 前記第1および第2基板のいずれか1つに配置され、前記測定域または前記試料室がいつ試料を収容したかを測定するため、前記測定域または前記試料室のいずれかを基準にして配置された少なくとも1つの指示電極とを備え、

前記作用電極が前記第1および第2基板のいずれか1つに配置され、前記対電極が前記第1および第2基板のいずれか1つに配置されている、請求項1～4のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項7】 前記測定域が試料を収容したこと、または前記試料室が試料を収容したことを知らせるため、センサー内に配置された指示電極を備えた請求項1～4のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項8】 前記指示電極が、作用電極または対電極でもある請求項5～7のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項9】 前記指示電極に接続され、前記指示電極が前記測定域または前記試料室に試料が収容されたことを知らせるとアクティブ化する視覚的または聴覚的サインをさらに備えた請求項5～8のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項10】 前記指示電極が、前記作用電極または前記対電極のいずれか1つと対向関係にある請求項5～9のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項11】 前記センサー内に配置された少なくとも2つの指示電極を備え、第1の指示電極が前記測定域または前記試料室への試料の充填が開始されたことを知らせ、第2の指示電極が前記測定域または前記試料室が実質的に試料で満たされたことを知らせる請求項5～10のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項12】 センサー内に配置された少なくとも2つの指示電極を備え、前記2つの指示電極は、第1の対／指示電極と第2の対／指示電極とを含み、前

記対電極が前記第1および第2の対／指示電極間に配置されている請求項5～1
0のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項13】 前記測定域の体積と前記試料室の体積とが同等である請求項
 1～12のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項14】 前記分析物がグルコースであり、前記分析物応答性酵素がグル
 ルコース応答性酵素である請求項1～13のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項15】 前記分析物が薬物である請求項1～13のいずれか1項に記
 載のセンサー。

【請求項16】 前記測定域の少なくとも2つの側面が前記作用電極および前
 記対電極によってその範囲を限定され、前記作用電極と前記対電極とが、前記測
 定域を間に有する対向電極対を任意に形成する請求項1～15のいずれか1項に
 記載のセンサー。

【請求項17】 前記酸化還元媒介剤が前記分析物を酸化し、pH7の0.1
 MのNaClでのサイクリックボルタンメトリーによって測定した前記酸化還元
 媒介剤の半波電位が、対／参照電極の電位に対して約+100ミリボルト以下と
 なるように構成および配置された請求項1～16のいずれか1項に記載のセンサ
 ー。

【請求項18】 前記酸化還元媒介剤が前記分析物を酸化し、pH7の0.1
 MのNaClでのサイクリックボルタンメトリーによって測定した前記酸化還元
 媒介剤の半波電位が、対／参照電極の電位とほぼ同等になるように構成および配
 置された請求項1～17のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項19】 前記酸化還元媒介剤が前記分析物を酸化し、pH7の0.1
 MのNaClでのサイクリックボルタンメトリーによって測定した前記酸化還元
 媒介剤の半波電位が、対／参照電極の電位に対して約-150ミリボルト以下と
 なるように構成および配置された請求項1～18のいずれか1項に記載のセンサ
 ー。

【請求項20】 前記センサー内において、前記試料液中における前記酸化還
 元媒介剤の有効拡散係数が、前記試料液中における前記分析物の有効拡散係数を
 下回り、好ましくは、前記試料液中における前記分析物の有効拡散係数より少な

くとも10倍少ない請求項1～19のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項21】 前記拡散性媒介剤の分子量が、少なくとも5,000ダルトンである請求項1～20のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項22】 前記酸化還元媒介剤が、前記対電極上よりも前記作用電極上において、より容易に電気分解されるように構成および配置された請求項1～21のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項23】 前記酸化還元媒介剤のモル量が、化学量論的に、分析物の平均的な生理学的正常量以下、好ましくは、化学量論的に、分析物の平均的な生理学的正常量の約20%以下である請求項1～22のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項24】 前記測定域に露出する前記作用電極の表面積が約0.01cm²以下である請求項1～23のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項25】 前記酵素の活性度が、1ユニット/cm³以下である請求項1～24のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項26】 前記拡散性酸化還元媒介剤が、前記対電極で反応して析出するよう構成および配置された請求項1～25のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項27】 試料液が前記測定域を満たしている場合に、前記酸化還元媒介剤の有効拡散係数と前記酸化還元媒介剤の濃度との積が、 1×10^{-12} モルcm⁻¹秒⁻¹以下である請求項1～26のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項28】 前記拡散性酸化還元媒介剤が前記作用電極上に配置されている請求項1～27のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項29】 前記分析物応答性酵素が、前記作用電極上に配置されている請求項1～28のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項30】 作用電極と対電極とを含み、前記作用電極と前記対電極が任意に対向関係に配置された電極対と、

前記作用電極と前記対電極とに隣接する約1μL以下の体積の試料液を収容する大きさに設定された測定域を含み、任意に約1μL以下の体積の試料液を収容する大きさに設定された試料室と、

前記試料室内に配置された拡散性酸化還元媒介剤と、

センサー内に配置され、前記測定域が試料を収容したことを知らせ、かつ前記分析物の電気分解を助ける指示電極とを備えた試料中における分析物濃度を測定するためのセンサー。

【請求項31】 前記酸化還元媒介剤が、拡散性の酸化還元媒介剤である請求項30に記載のセンサー。

【請求項32】 前記測定域への試料の充填が開始されたことを知らせる第1の指示電極と、前記測定域が試料で満たされたことを知らせる第2の指示電極とを備えた請求項30および31のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項33】 前記作用電極が配置された第1基板と、前記対電極が配置された第2基板と、

前記第1基板上に配置され、前記作用電極に電気的に接続された作用電極コンタクトパッドと、

前記第2基板上に配置され、前記対電極に電気的に接続された対電極コンタクトパッドと、

前記指示電極に電気的に接続された指示電極コンタクトパッドとをさらに備え、

前記指示電極および前記指示電極コンタクトパッドが、前記第1および第2基板のいずれか1つに配置され、前記指示電極コンタクトパッドが、前記作用電極コンタクトパッドおよび前記対電極コンタクトパッドのいずれか1つに近接して配置され、

前記作用電極コンタクトパッド、前記対電極コンタクトパッド、および前記指示電極コンタクトパッドが、測定器との電気的な接続のため、前記第1および第2基板によって定められる露出した切欠き領域を有する請求項30～32のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項34】 センサー内に配置された少なくとも2つの指示電極を備え、前記2つの指示電極は、第1の対／指示電極と第2の対／指示電極とを含み、前記対電極が前記第1および第2の対／指示電極間に配置されている請求項30～33のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項35】 請求項1～34のいずれか1項に記載の電気化学センサーに

試料を接触させる工程と、

前記作用電極でセンサー信号を発生させる工程と、

前記センサー信号を用いて前記分析物の濃度を測定する工程とを含む、試料中の分析物濃度を測定する方法。

【請求項36】 拡散性酸化還元媒介剤によって発生するバックグラウンド信号が、

(a) 平均的な生理学的正常量の分析物の酸化または還元によって発生する信号の5倍以下、あるいは

(b) 平均的な生理学的正常量からの平均偏差量に相当する分析物の酸化または還元によって発生する信号の5倍以下、あるいは

(c) 5mMの分析物の酸化または還元によって発生する信号の5倍以下である

請求項35に記載の方法。

【請求項37】 前記分析物の濃度測定が、前記センサー信号を用いたクロメトリーによる分析物の濃度測定を含む請求項35および36のいずれか1項に記載の方法。

【請求項38】 前記分析物の濃度測定が、前記センサー信号を用いたアンペロメトリーによる分析物の濃度測定を含む請求項35および36のいずれか1項に記載の方法。

【請求項39】 前記分析物の濃度の測定が、前記センサー信号を用いたポテンシオメトリーによる分析物の濃度測定を含む請求項35および36のいずれか1項に記載の方法。

【請求項40】 前記分析物の濃度測定が、前記センサー信号を用いたクロノアンペロメトリーによる分析物の濃度測定を含む請求項35および36のいずれか1項に記載の方法。

【請求項41】 前記分析物の濃度測定が、前記センサー信号を用いたクロノポテンシオメトリーによる分析物の濃度測定を含む請求項35および36のいずれか1項に記載の方法。

【請求項42】 前記分析物の濃度の測定が、前記センサー信号を用いたコットレル測定技法 (Cottrell measurement technique) よる分析物の濃度測定を含

む請求項 3 5 および 3 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 3】 測定器具に一バッチの前記電気化学センサーに関する校正データを提供する工程をさらに含み、

前記校正データは一バッチの電気化学センサーにおけるバックグラウンド電荷の大きさに関する情報を含み、

前記分析物の濃度を測定する前記工程は、前記センサー信号および前記校正データを用いて前記分析物の濃度を測定することを含む請求項 3 5 ~ 4 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 4】 試料を請求項 1 ~ 3 4 のいずれか 1 項に記載の電気化学センサーに接触させる工程と、

前記試料室が試料を有していることを示す指示電極からの信号を観察する工程と、

前記作用電極と前記対電極との間に電位を印加し、前記試料中の分析物を電気分解する工程と、

前記試料中の前記分析物の電気分解に応じ、前記センサーより分析物反応性信号を発生させる工程と、

前記分析物反応性信号を用いて前記分析物の濃度を測定する工程とを備えた試料中の分析物濃度を測定する方法。

【請求項 4 5】 (a) 第 1 基板上に複数の作用電極を形成することと、

(b) 第 2 基板上に複数の対電極を形成することと、

(c) 前記第 1 および第 2 基板のいずれか 1 つにスペーサー層を配置することと、

(d) 前記スペーサー層の一部分を除去して試料室領域を定めることと、

(e) 前記第 1 および第 2 基板を張り合わせることと、

(f) 張り合わせた前記基板より、前記作用電極の少なくとも 1 つ、前記対電極の少なくとも 1 つ、および前記試料室領域の少なくとも 1 つをそれぞれ備えた複数の電気化学センサーを分離させることとを含む、請求項 1 ~ 3 4 のいずれか 1 項に記載の電気化学センサーの製造方法。

【請求項 4 6】 前記第 1 基板が基板上の第 1 の領域であり、前記第 2 基板が

同基板上の第2の領域であり、さらに、

前記基板を折り曲げ、前記基板上の第1および第2領域を重ねることを含む請求項45に記載の方法。

【請求項47】 前記複数の電気化学センサーの分離には、第1および第2基板を裁断し、前記電気化学センサーを分離させると共に、前記電気化学センサーの前記試料室の少なくとも一端を定めることが含まれる請求項45～46のいずれか1項に記載の方法。

【請求項48】 前記第1および第2基板のいずれか1つに複数の指示電極を形成することをさらに含む請求項45～47のいずれか1項に記載の方法。

【請求項49】 前記スペーサー層を前記第1および第2基板のいずれか1つに配置した後に、前記スペーサー層の一部分を除去して、前記試料室を定める請求項45～48のいずれか1項に記載の方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION INFORMATION		International Application No. PCT/US 99/23425
IPC 7 C12Q1/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC.		
B. FIELD SEARCHED		
Mention classification (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q 801/00		
Document titles searched other than those mentioned above to the extent that such documents are included in the file(s) searched		
Comments and observations concerning the international search (name of the body and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Description of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant document No.
Y	WO 98 35223 A (TOMASCO MICHAEL F.; HELLER ADAM (US); HELLER E & CO (US); SAY JAMES) 13 August 1998 (1998-08-13) the whole document	1, 2, 4, 30, 35, 40, 41
Y	VIDAL J C ET AL: "A chronospectrometric sensor for hydrogen peroxide based on electron transfer between immobilized horseradish peroxidase on a glassy carbon electrode and a diffusing ferrocene mediator" SENSORS AND ACTUATORS B, CH, ELSEVIER SEQUOIA S.A., LAUSANNE, vol. 21, no. 2, 1 August 1994 (1994-08-01), pages 135-141, XP004012915 ISSN: 0925-4005 abstract	1, 2, 4, 30, 35, 40, 41
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family numbers are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
17* document defining the current state of the art which is not considered to be a citable reference		
18* earlier document not published or not filed before the International filing date		
19* document which may form double or partly cited (i.e. which is cited in addition to the document defining the current state of the art or other special reasons for specifying)		
20* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or convention		
21* document published prior to the International filing date but later than the priority date thereof		
17* later document published after the International filing date of priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention		
18* document of particular relevance, the claimed invention derivative, constituent novel or cannot be considered to invent on its own when the document is cited alone		
19* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to invent on its own, especially when the document is cited with one or more other such documents, such combination being relevant to a person skilled in the art		
20* document number of the same patent family		
Date of the actual acceptance of the International search	Date of mailing of the International search report	
11 February 2000	18/02/2000	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 30 130 Potsdamerstr. 2 D-1020 Berlin Tel. (030) 346-2610, Tel. 01 900 2016 Fax (030) 346-2016	Authorized officer Duchatellier, M	

page 1 of 2

BEST AVAILABLE COPY

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 99/23425

C O P Y I N G D O C U M E N T S C O N F I R M E D T O B E T H E B E S T		Reference to claim no.
Category	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	
A	WO 91 09139 A (BOEHRINGER MUNHEIM CORP) 27 June 1991 (1991-06-27) claim 1	1
A	WO 97 00441 A (MENTEC AMERICA CORP ;HODGES ALASTAIR MCINDOE (AU); BECK THOMAS (IL) 3 January 1997 (1997-01-03) claim 1	1
A	US 5 698 947 A (LAU SHEK-HOSS ET AL) 9 December 1997 (1997-12-09) abstract	1

page 2 of 2

BEST AVAILABLE COPY

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on potentially relevant documents

a. Related Application No.
PCT/US 99/23425

Patent document cited in search report	Publication date	Priority number(s)	Publication date
WO 9836225 A	13-08-1998	AU 6157898 A EP 0958496 A	25-08-1998 24-11-1999
WO 9109139 A	27-08-1991	AT 124990 T AU 634963 B AU 7171691 A CA 2069946 A DE 69020968 D DE 69020968 T EP 0605454 A ES 2075355 T US 5508171 A US 5288636 A	15-07-1995 04-03-1993 18-07-1991 16-03-1991 17-06-1995 15-02-1996 20-09-1992 16-10-1995 16-04-1995 22-02-1994
WO 9700441 A	03-01-1997	AU 712039 B AU 5992296 A CA 2222525 A EP 0873514 A JP 11508011 T	18-11-1996 15-01-1997 03-01-1997 20-10-1995 17-08-1999
US 5695947 A	09-12-1997	NONE	

BEST AVAILABLE COPY

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ¹	識別記号	F I	テマコード (参考)
// C 1 2 Q 1/26		G 0 1 N 27/46	3 3 8
			3 8 6 G
(31) 優先権主張番号	0 9 / 2 9 5, 9 6 2		
(32) 優先日	平成11年4月21日 (1999. 4. 21)		
(33) 優先権主張国	米国 (U.S.)		
(81) 指定国	EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW		
(72) 発明者	ヘラー、エフレイム アメリカ合衆国、94618 カリフォルニア 州、オークランド、スターク クノル プ レイス 44		
(72) 発明者	マオ、フェイ アメリカ合衆国、94555 カリフォルニア 州、フレモント、ベネディック レイン 34379		
(72) 発明者	ヴィヴォロ、ジョセフ、エイ. アメリカ合衆国、94117 カリフォルニア 州、サン フランシスコ、ハイト ストリ ート 1548		
(72) 発明者	ファンダーバーク、ジェフリー、ヴィ. アメリカ合衆国、94536 カリフォルニア 州、フレモント、キャリッジ サークル コモン 37670		
(72) 発明者	コルマン、フレデリック、シー. アメリカ合衆国、94605 カリフォルニア 州、オークランド、キャンパス ドライブ 13864		
(72) 発明者	クリッシュナン、ラジェッシュ アメリカ合衆国、94536 カリフォルニア 州、フレモント、セントラル アヴェニュー 一 4211、アパートメント # 1		

Fターム(参考) 2G045 AA01 AA06 CA26 DA31 FB01
FB05 GC20 JA07
4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ23 QQ68
QR03 QR50 QX05